

Struktur und Funktion der Proteinkinase CK2:
neue Einsichten aus kristallographischen und kalorimetrischen Studien

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Inessa Ermakova

aus Kaliningrad, Rußland

Köln 2004

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschliesslich Tabellen, Karten und Abbildungen - , die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. D. Schomburg betreut worden.

Inessa Ermakova

Berichterstatter:	Prof. Dr. Dietmar. Schomburg
	Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt
Einreichung des Gesuchs:	20.10.2004

Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Schomburg danke ich für das interessante und herausfordernde Thema sowie die gute Rahmenbedingungen am Institut für Biochemie.

Bei Fr. Prof. Dr. S. Waffenschmidt möchte ich mich herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Karsten Niefind aussprechen, weil er mich in jeder Phase der Arbeit sehr sachkundig und richtungsweisend begleitete, mich stets ermunterte und viel Geduld zeigte.

Bei Herrn Prof. Dr. O.-G. Issinger möchte ich mich für die gute Kooperation und die angenehme Zusammenarbeit während des Aufenthaltes in Dänemark bedanken.

Ich bedanke mich bei Fr. Dr. Nadja Hellmann für ihre Hilfsbereitschaft und sehr nützlichen Ratschläge bei den kalorimetrischen Untersuchungen.

Dr. Thierry Chardot bin ich sehr dankbar für die fundierten Empfehlungen für meine wissenschaftliche Arbeit und nette Arbeitsbedingungen während des Aufenthaltes in seiner Arbeitsgruppe in Paris.

Für die wertvolle technische Assistenz möchte ich mich bei Elena Bakuscheva, Sabine Lohmer und Anja Hochheiser bedanken.

Michael Zimmermann danke ich für die exzellente Bedienung der EDV-Systeme und für seine sofortige Hilfsbereitschaft.

Thomas Breitenbach bin ich sehr dankbar für seine Einweisung in die Kalorimetrie der Proteine und zahlreiche Diskussionen und Fragestellungen.

Annette Faust danke ich für ihre konstruktive Hinweise und große Hilfe während der Messungen am Synchrotron.

Großen Dank schulde ich vor allem allen, die die Zeit für die Korrektur meiner Arbeit gefunden haben.

Nicht nur für das angenehme Klima im Labor, sondern auch für die nette private Gespräche

und moralische Unterstützung möchte ich mich bei Sabine Lohmer bedanken.

Svetlana Tsvetkova und Dr. Sergei Strelkov bin ich sehr dankbar für ein kleines Stückchen meiner Heimat, die sie beide für mich erschaffen haben.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft und Prof. Dr. W. Petersen-Stiftung danke ich für die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung meiner Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

3-Buchstaben und 1-Buchstabencode der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Va	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

Sonstige Abkürzungen

Å	Ångström (1 Å = 0.1 nm)
<i>a, b, c</i>	Gitterachsen im realen Raum
α, β, γ	Winkel zwischen den Gitterachsen
CK2	Casein Kinase 2
B	Temperaturfaktor
E. coli	Darmbakterium Escherichia Coli
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
G	Gramm
h	Stunde
I	Intensität
l	liter

Abkürzungsverzeichnis

m	Meter
MALDI	matrix-assisted-laser-desorption/ionization
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
DSC	Differentialrasterkalorimetrie
K_b	Bindungskonstante
T_m	Schmelztemperatur
ΔH	Enthalpieänderung
ΔC_p	Änderung der Wärmekapazität
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
Mol	Einheit der Stoffmenge
MR	Molekularer Ersatz
MW	Molekulargewicht
λ	Wellenlänge
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
pH	pondus hydrogenii
R_{cryst}	kristallographischer R-Wert
R_{free}	freier R-Wert
R_{sym}	linearer R-Wert
R_{work}	R-Wert des Arbeitsdatensatzes
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TOF	Time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VM	Matthews-Koeffizient
v/v	Volumenprozent

Zusammenfassung

Die Proteinkinase CK2 ist ein heterotetrameres Enzym, das aus zwei katalytischen Untereinheiten (CK2 α) und zwei regulatorischen Untereinheiten (CK2 β) besteht. Diese sogenannte „CK2 Holoenzym“ wird aus einem stabilen CK2 β -Dimer aufgebaut, an das zwei CK2 α -Ketten gebunden sind, und zwar so, dass sie untereinander keinen Kontakt haben. Im isolierten Zustand existiert CK2 α als Monomer, isolierte CK2 β liegt dagegen als Dimer vor. CK2 α gehört zur CMGC-Familie der eukaryontischen Proteinkinasen. Ihre nächsten Verwandten sind die cyclinabhängigen Kinasen und die MAP-Kinasen. Homologe von CK2 β sind dagegen nicht bekannt. CK2 zeigt duale Co-Substratspezifität, d.h. das Enzym kann die beiden Purinnukleotide ATP und GTP als Phosphat-Donator verwenden. CK2 ist sehr wichtig für die Vermehrung und Überleben der Zellen. Durch die Co-Kristallisation dieser Proteine mit dem ATP-Analogon AMPPNP und einem Peptidsubstrat sollte der Mechanismus der Substratbindung und die duale Co-Substratspezifität besser verstanden werden. In der folgenden Arbeit werden die Kristallstrukturen der zwei Proteine *hsCK2 α Δ C* und *hsCK2 α Δ C-V66A/M163/L* dargestellt. In beiden Fällen wurden die binären Komplexe mit AMPPNP strukturell charakterisiert. Das Protein *hsCK2 α Δ C* kristallisierte in der Raumgruppe P2₁. Die Auflösung lag im Bereich bis zu 2.3 Å. Der wichtigste Befund aus dieser Kristallstruktur war die Entdeckung, daß der β 4/ β 5-Loop in „geschlossener“ Konformation vorliegt. Im Vergleich dazu besitzt die CK2 α im Holoenzym dieses strukturelle Element im „offenen“ Zustand. Bei der Modellierung der isolierten CK2 α an die Stelle von CK2 α im Holoenzym kommt es zu großen sterischen Einschränkungen, wenn sich dieser Loop im „geschlossenen“ Zustand befindet. Dies bestätigt sehr gut die neue, noch nicht sehr weit verbreitete Vorstellung, dass CK2 α und CK2 β *in vivo* unabhängig voneinander existieren und spezifische biologische Funktionen wahrnehmen können, ohne eine Holoenzym bilden zu müssen. Mit der Lösung der Kristallstruktur der Mutante *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L* ist es gelungen, den Grund der dualen Co-Substratspezifität besser zu verstehen. Diese Mutante war geplant worden mit dem Ziel, die Cosubstratspezifität zu schärfen und eine deutliche Präferenz zugunsten von ATP zu erzeugen. Die Erreichung dieses Zieles wurde durch kinetische Messungen bestätigt. Außerdem wurde das Protein in der Raumgruppe P4₃2₁2 kristallisiert. Bei dem Datensatz der besten Qualität erreichte die Auflösung 1.6 Å. Es wurden strukturelle Veränderungen festgestellt, die mit der verminderten Neigung, GTP umzusetzen, im Einklang standen. Durch kalorimetrische Studien wurde die Thermostabilität von CK2 α , CK2 β und des CK2-Holoenzymes in Anwesenheit von einigen spezifisch bindenden Stoffen untersucht. Dabei wurde ein stabilisierender Effekt von CK2 β auf CK2 α festgestellt. Darüber hinaus ist es gelungen durch Isothermale Titrationskalorimetrie und durch Differentiale Rasterkalorimetrie die Bindungskonstante zwischen den beiden Komponenten des Holoenzymes zu bestimmen. Sie liegt im Bereich von 10⁸ M⁻¹. Dieser Wert erlaubt es, über einen nicht-obligaten und transienten Komplex zu sprechen und steht im Einklang mit der

Zusammenfassung

früher gelösten Kristallstruktur des humanen CK2-Holoenzym.

Abstract

Protein kinase CK2 is a heterotetrameric enzyme composed of two catalytic (CK2 α) and two regulatory (CK2 β) subunits. This so-called “CK2-holoenzyme” is built from one stable CK2 β -dimer and from two CK2 α - chains, which are bound to CK2 β -dimer and do not make direct contact with each other. In isolated state CK2 α exists as a monomer. In contrast CK2 β is available as a dimer. CK2 α belongs to the CMGC group of the eucaryotic protein kinases. Its nearest neighbours are cyclin –dependent kinases (CDK) and the mitogen-activated kinases. Homologous proteins for CK2 β are not established. CK2 shows the dual-co-substrate specificity, i.e. this enzyme can use ATP or GTP as phosphoryl donor. Protein kinase CK2 is a highly conserved protein kinase ever found in all eukaryotic cells investigated so far. The enzyme is important for cell proliferation and biomedically relevant because an overexpression of its catalytic subunit can cause lymphoma. The co-crystallization of these proteins with a non-hydrolyzable analog of ATP AMPPNP as a co-substrate and a peptide substrate may help in the investigation of the mechanism of the substrate binding and provide the much better understanding of the dual co-substrate specificity. The present work describes the crystal structures of two proteins *hsCK2 α Δ C* und *hsCK2 α Δ C-V66A/M163/L*. In both cases the binary complexes were characterised structural with AMPPNP. The crystals of *hsCK2 α Δ C* belongs to the monoclinic space group P2₁ and the crystal structure was refined up to 2.3 Å resolution. The most important finding from this crystal structure is the discovery of β 4/ β 5-loop in closed conformation form in contrast to the open conformation form observed for the CK2 α subunits of the CK2 holoenzyme. CK2 α monomers with this closed conformation are unable to bind CK2 β dimers because of sterical reasons. This finding confirms the growing evidence that CK2 α monomers and CK2 β dimers can exist *in vivo* independently from the CK2 holoenzyme and may possess physiological role of their own. The solved crystal structure of the mutant *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L* affords better understanding of the reason for the CK2 ability to use both ATP and GTP as phosphorylating agents. This mutant possesses the clear preference for ATP binding compared to GTP, which was confirmed by kinetic measurements. The crystals of this protein belong to the tetragonal space group P4₃2₁2. The best quality achieved for this dataset was up to 1.6 Å resolution. The established conformational changes that occur upon AMPPNP binding comply with the reduced ability to use GTP. The thermostability of the CK2 α , CK2 β and CK2 holoenzyme was examined by calorimetric studies. Thereby the stabilizing effect of CK2 β on CK2 α subunit was established. Moreover it was succeeded to determine the binding constants between the α and β subunits in the CK2 holoenzyme by the isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry. The values of the binding constant were found to be about 10⁸ M⁻¹. Such values point to a non-obligate and transient complex and comply with the former solved crystal structure of *hsCK2* holoenzyme.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Phosphorylierung der Proteinkinasen	1
1.2 Proteinkinasen: Allgemeine Einteilung	3
1.3 Proteinkinase CK2.....	4
1.3.1 Co-Substrat- und Substrat-Spezifität	5
1.3.2 Potentielle Regulatoren von CK2.....	8
1.3.4 Physiologische Bedeutung	9
1.4. Ziele der Arbeit	13
2 Theoretische Grundlagen der ausgewählten Methoden	14
2.1 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	14
2.1.1 Beschreibung des Gerätes	14
2.1.2 Durchführung der ITC- Messungen	14
2.1.3 Datenanalyse	16
2.2 Differentialrasterkalorimetrie	19
2.2.1 Durchführung der DSC- Messungen.	19
2.2.2 Informationsgehalt der DSC- Daten.....	20
2.3 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	23
2.3.1 Proteinkristallisation.....	23
2.3.2 Strukturlösung durch molekularen Ersatz.....	26
2.3.3 Verfeinerung der Struktur mit „restraints“ und „constraints“	30
3 Material und Methoden	32
3.1 Verwendete Materialien, Geräte und EDV-Systeme	32
3.2 Molekularbiologische Arbeiten	34
3.2.1 LB-Medium	34
3.2.2 Agarplatten	34
3.2.3 Kompetente Zellen.....	34
3.2.4 Transformation.....	35
3.2.5 Expression	35
3.3 Proteinreinigung	36
3.3.1 Zellaufschluss und Zentrifugation	37
3.3.2 Chromatographische Methoden	37
3.3.3 Konzentrierung durch Ultrazentrifugation	38
3.4 Proteinanalytische Methoden	39
3.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	39
3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	39
3.4.4 Massenspektrometrie	39
3.5 Kalorimetrische Messungen	40

3.5.1 Differentialrasterkalorimetrie (DSC).....	40
3.6 Proteinkristallisation	41
3.7 Röntgendiffraktionsmessungen.....	42
3.7.2 Montage des Kristalls	42
3.8 Rechenmethoden	42
3.8.1 Datenreduktion	42
3.8.2 Strukturlösung und Verfeinerung.....	42
4 Ergebnisse.....	49
4.1 Überblick über die experimentelle Arbeit	49
4.2 Die <i>hsCK2α</i> Δ C	50
4.2.1 Expression und Reinigung von <i>hsCK2α</i> Δ C	50
4.2.2 Reinheitskontrolle	52
4.2.3 Kristallisation der <i>hsCK2α</i> Δ C	53
4.2.4 Diffraktionsmessungen	56
4.2.6 Strukturverfeinerung	58
4.2.7 Stereochemische Qualität der ermittelten Struktur.....	59
4.2.8 Kalorimetrische Untersuchungen der <i>hsCK2α</i> Δ C in der Anwesenheit von SO_4^{2-} - Ionen	62
4.3 <i>hsCK2α</i> Δ C-V66A/M163L	62
4.3.1 Ausgangsbedingungen.....	62
4.3.2 Reinheitskontrolle	63
4.3.3 Kristallisation der <i>hsCK2α</i> Δ C-V66A/M163L	64
4.3.4 Diffraktionsmessungen	66
4.4 <i>hsCK2</i>	71
4.4.1 Expression und Reinigung des <i>hsCK2</i> -Holoenzym	71
4.4.3 Kristallisation der <i>hsCK2</i>	75
4.5 <i>spCK2α</i>	79
4.5.1 Expression und Reinigung der <i>spCK2α</i>	79
4.5.2 Reinheitskontrolle	80
4.5.3 Kristallisation der <i>spCK2α</i>	81
4.5.4 <i>spCK2α</i> . Diffraktionsmessungen	84
4.6 <i>hsCK2β</i>	86
4.6.1 Expression und Reinigung der <i>hsCK2β</i>	86
4.6.2 Reinheitskontrolle	87
4.7 Kalorimetrische Studien	88
4.7.1 Isothermale Titrationskalorimetrie	88
4.7.2 Differentialrasterkalorimetrie.....	90
5 Diskussion	100
5.1 Kristallographische Studien.....	100

5.1.1 <i>hsCK2α</i> Δ C	100
5.1.2 <i>hsCK2α</i> Δ C-V166A/M63L	110
5.2 Kalorimetrische Studien	119
5.2.1 Bindungsaffinität zwischen <i>hsCK2β</i> und <i>hsCK2α</i>	119
5.2.2 Strukturelle Basis der Thermostabilität des <i>hsCK2</i> -Holoenzymes und seiner einzelnen Untereinheiten	123
6 Zusammenfassung	128
7 Ausblick.....	129
8 Literaturverzeichnis.....	130
Lebenslauf	140

1 Einleitung

1.1 Phosphorylierung der Proteinkinasen

„Die reversible Phosphorylierung der Proteine reguliert fast jeden Aspekt des Zellebens.“ Dieser Satz stammt von den Nobelpreisträgern E. Fischer und E. Krebs, die diesen Preis 1992 für ihre Pionierarbeiten auf dem Gebiet der Proteinphosphorylierung erhalten haben. Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung, die durch unterschiedliche Proteinkinasen und Proteinphosphatasen katalysiert werden, können Proteinfunktionen sehr stark beeinflussen. Beispielweise können sie die biologische Aktivität von Proteinen reduzieren oder erhöhen. Sie können Proteine stabilisieren oder sie für den Abbau markieren. Weiterhin können durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen intrazelluläre Transportprozesse zwischen den Zellkompartimenten und Wechselwirkungen zwischen Proteinen beeinflusst werden (Cohen P., 2002).

Es ist seit langem bekannt, daß Phosphogruppen an Proteine gebunden vorliegen können. Solche „Phosphoproteine“ wurden in Milch (Kasein) oder im Eigelb (Phosvitin) gefunden. Die Existenz solcher Proteine wurde als die Folge einer metabolischen Reaktion betrachtet. 1954 wurde erstmals die Aktivität eines Enzyms beobachtet, das eine Phosphogruppe auf ein anderes Protein überträgt. Diese Reaktion wurde als Phosphorylierung bezeichnet. Das dafür verantwortliche Enzym war ein Leber-Enzym, das die Phosphorylierung von Kasein katalysiert und daher als Proteinkinase benannt wurde.

Wenig später stellten Fischer und Krebs fest, daß Phosphorylierung und Dephosphorylierung den Glykogen-Metabolismus regulieren können. Dies wies darauf hin, daß die reversible Phosphorylierung die Enzymaktivität kontrollieren kann.

Die Übertragung von Phosphatresten auf Proteine wird in der Zelle durch unterschiedliche Enzyme katalysiert. Obwohl diese Enzymfamilie sehr groß ist, weisen alle Mitglieder bestimmten Eigenschaften auf und bilden daher eine Klasse von Proteinen, die Proteinkinasen genannt wird. Sie alle haben die Fähigkeit, eine Phosphogruppe vom energietragenden Molekül ATP abzuspalten und auf bestimmte Aminosäuren (meistens die Hydroxygruppe (-OH) von Serin, Threonin oder Tyrosin) des Substrat-Proteins zu übertragen (Abbildung 1).

Die zweite Klasse der Enzyme, die Proteinphosphatasen, ist für die umgekehrte Reaktion, die Dephosphorylierung, verantwortlich, wobei eine Phosphatgruppe aus dem Protein entfernt wird. Heutzutage ist bekannt, daß praktisch jedes dritte im menschlichen Genom kodierte Protein kovalent gebundenes Phosphat enthält. Eine und dieselbe Proteinkinase kann mehrere verschiedene Proteine phosphorylieren, und ein und dasselbe Protein kann von mehreren verschiedenen Proteinkinasen phosphoryliert werden. Ein Protein kann bis zu

20 verschiedene Phosphorylierungsstellen aufweisen, die von verschiedenen Proteinkinasen (überlappend oder nicht) erkannt werden und in einer geordneten oder ungeordneten Reihenfolge phosphoryliert werden.

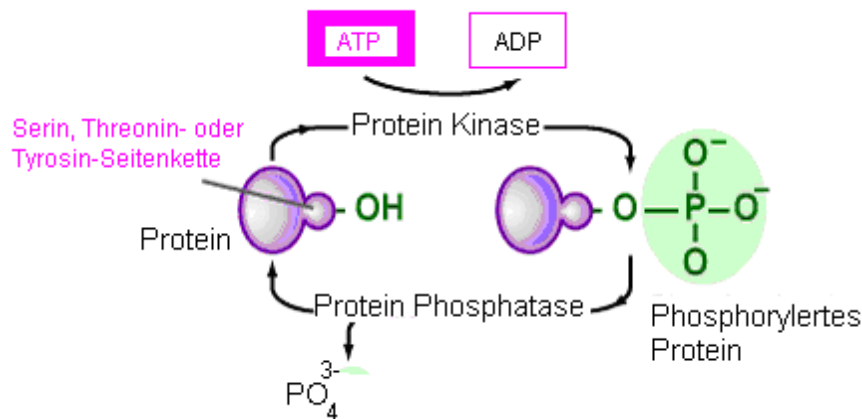


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Mechanismus der Phosphorylierungs-Dephosphorylierungs-Reaktion.

Eine anormale Phosphorylierung ist als Grund oder Folge bei vielen menschlichen Krankheiten anerkannt. Beispielsweise kann die anormale Phosphorylierung der MAP-Proteine („*microtubule-associated protein*“) durch MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) die Alzheimerkrankheit verursachen.

Weiterhin konnte die Inaktivierung der mitochondrialen Pyruvat-Dehydrogenase durch Phosphorylierung erklärt werden. Die Stimulation der Lipolyse im Fettgewebe durch Adrenalin verläuft über einen Phosphorylierungsmechanismus. Es wurden auch die Phosphorylierungskaskaden entdeckt, wobei die Aktivierung einer Kinase zur Aktivierung der nächsten Kinase führt (Johnson L.N & Lewis R.J., 2001). Durch solche Enzymkaskaden können Signale verstärkt werden.

In Prokaryonten (auch in Eukaryonten) existieren Proteinkinasen, die Histidin-, Lysin-, oder Arginin-Reste phosphorylieren. Die gebildeten Phosphate sind kurzlebiger und hydrolysieren meist spontan (wenn auch mit unterschiedlichen Halbwertszeiten, je nach Struktur der Phosphorylierungsstelle). Es werden dazu also keine Phosphatasen benötigt. Der Grad der Phosphorylierung eines Proteins wird von der Aktivität der Kinasen bestimmt.

1.2 Proteinkinasen: Allgemeine Einteilung

Die Proteinkinasen werden anhand ihrer Aminosäuresequenz in verschiedene Untergruppen eingeteilt. Die in den Gruppen vertretenen Enzyme haben meistens ähnliche Spezifitäten für die zu modifizierenden Zielproteine und sind häufig auch sehr ähnlich in der Art und Weise, wie sie reguliert werden. Darüber hinaus gibt es in den Untergruppen auch sehr große strukturelle Ähnlichkeiten.

Proteinkinasen stellen die zweitgrößte Proteinfamilie in höheren Zellen dar. Man schätzt, daß die Gene, die für Proteinkinasen kodieren, ca. 1-2% des gesamten menschlichen Genoms ausmachen und nach Abschluß des menschlichen Genomprojekts die Gesamtzahl bei bis zu tausend verschiedenen Proteinkinasen liegen wird.

Das menschliche Genom enthält ungefähr die doppelte Anzahl an Proteinkinasen wie ein Fliegen- oder Wurm-Genom. Die 21 Proteinkinase-Familien, die bei der Fliege entdeckt wurden, konnten auch beim Mensch identifiziert werden (Abbildung 2). Beim Wurm treten diese Familien dagegen nicht auf. 24 Familien wurden beim Wurm gefunden, von denen keine bei der Fliege vorkommt. 15 von diesen Familien sind für den Wurm spezifisch. Keine Familie, die ausschließlich für die Fliege charakteristisch ist, wurde festgestellt (Manning G., et al., 2002).

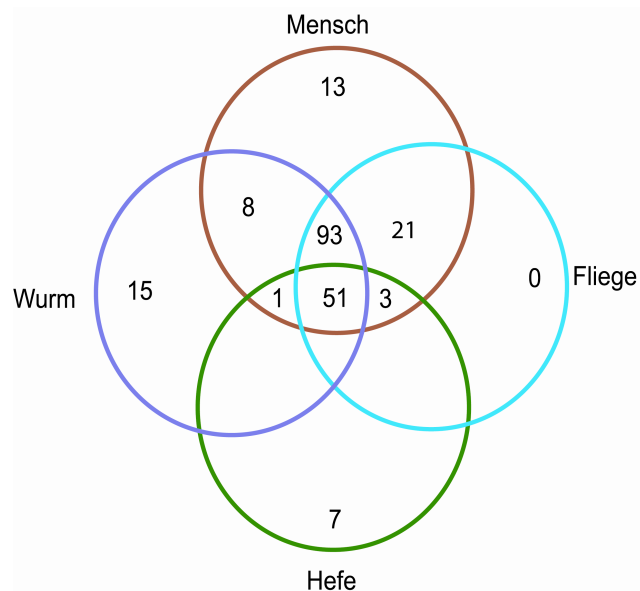


Abbildung 2: Die Verteilung der 209 Kinase-Unterfamilien zwischen den 4 Genomen von Mensch, Fliege, Wurm und Hefe (Manning G., et al., 2002).

Die katalytischen Domänen der Proteinkinasen, die ca. 250-300 Aminosäurereste enthalten, sind einander sehr ähnlich. Drei wichtige Funktionen wurden dieser Domäne zugeschrieben (Hanks S.K. & Hunter T., 1995):

- 1) Bindung und Orientierung des ATP- oder GTP-Phosphoryl-Donors im Komplex mit einem zweiwertigen Kation (gewöhnlich Mg^{2+} oder Mn^{2+});
- 2) Bindung und Orientierung des Protein- oder Peptid-Substrats;
- 3) Transport des γ -Phosphats von ATP (oder GTP) zum Akzeptor – dem Hydroxylrest (Ser, Thr oder Tyr) des Protein- oder Peptid-Substrats.

Proteinkinasen werden nach ihrer Spezifität in zwei Gruppen eingeteilt: Die eine Gruppe phosphoryliert Proteine an den Aminosäuren Serin und/oder Threonin, die andere an der Aminosäure Tyrosin. Weiterhin werden sie in Unterfamilien unterteilt, in Abhängigkeit von den grundlegenden strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser Enzyme (Hanks S.K. & Hunter T., 1988).

Die Proteinkinasen treten auch bei Prokaryonten auf. Die Protein-Phosphorylierung spielt eine entscheidende regulative Rolle bei zahlreichen bakteriellen Prozessen inklusive Chemotaxis, Bakteriophagen-Infektionen, Nährstoffaufnahme und Gen-Transkription.

1.3 Proteinkinase CK2

Die Proteinkinase CK2 ist ein Tetramer, das aus zwei katalytischen α -/ α' -Untereinheiten und zwei regulatorischen β -/ β' -Untereinheiten (Walz K., 1997) besteht. Die α -/ α' - Untereinheiten existieren als Monomere. Es wurde festgestellt, daß sogar in der Abwesenheit von CK2 α -Untereinheiten die CK2 β -Untereinheiten ein stabiles Dimer bilden. Das weist darauf hin, daß die Bildung des CK2 β -Dimers für die Assemblierung des CK2-Holoenzym notwendig ist (Graham K.C. & Lichfield D.W., 2000). Die katalytischen Untereinheiten sind biologisch aktiv, im Gegensatz dazu zeigen die CK2 β -Untereinheiten keine Aktivität. Jedoch stimuliert die Anwesenheit von CK2 β die CK2 α -Aktivität bis zu zehnfach. Außerdem zeigt CK2 β eine stabilisierende Wirkung auf die CK2 α -Untereinheit gegenüber Proteolyse und thermischer Denaturierung, und bestimmt die Spezifität ihrer Wechselwirkungen mit Substraten und Inhibitoren (Meggio F., 1992).

Aufgrund der Klassifikation nach Hanks S. K. und Hunter T. gehört die Proteinkinase CK2 zur CMGC-Unterfamilie. Ihre nächsten Verwandten sind die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) oder die Mitogen-aktivierten Kinasen (MAP), die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind.

CK2 ist praktisch bei allen Eukaryonten gefunden worden. Die evolutionär frühe Eukaryonten

(Protozoen) *Theileria parva* und *Dictyostelium discoideum* exprimierten nur die katalytische CK2 α -Untereinheit. CK2 wurde auch in verschiedenen Hefen gefunden: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans*. Die Vertreter des Pflanzenreichs *Zea mays* und *Arabidopsis thaliana* exprimieren auch CK2. CK2 wurde im Fadenwurm und in Insekten, Amphibien und Fischen, Vögel und Säugetieren identifiziert. CK2 ist nicht nur in den unterschiedlichen Spezies verbreitet, sondern auch in fast allen Geweben hoher Organismen exprimiert. CK2 wurde unter anderem in der Plasmamembran, im Zytoplasma und in Mitochondrien entdeckt (Faust M. & Montenarh M., 2000). Die Aktivität in den unterschiedlichen Geweben ist verschieden. CK2 α ist am stärksten in Hoden und Gehirn exprimiert, gefolgt von Milz, Leber und Lunge. Die kleinsten Mengen von CK2 α wurden in Nieren und Herz detektiert. Die CK2 α' -Untereinheit wird nur in Hoden und Gehirn exprimiert. Große Mengen der CK2 β -Untereinheit sind in Hoden, Gehirn und Milz nachweisbar (Guerra B., 1999).

Die Existenz des CK2-Holoenzymes bedeutet nicht, daß CK2 α - und CK2 β -Untereinheiten nur als seine Komponenten funktionieren. Die Anwesenheit von CK2 β wurde an den Stellen beobachtet, wo keine katalytischen Untereinheiten detektiert wurden. Außerdem wurden andere Wechselwirkungspartner für CK2 β identifiziert, beispielsweise c-Mos-, A-Raf-, Chk1-Kinasen oder „*Fas associated factor*“ (FAF1) (Lieberman S.L. & Ruderman J.V., 2004; Boldyreff B. & Issinger O.G., 1997; Guerra B., et al., 2004; Jensen H.H., et al., 2001).

1.3.1 Co-Substrat- und Substrat-Spezifität

Die Proteinkinase CK2 besitzt eine duale Co-Substrat-Spezifität. Im Gegensatz zu anderen Proteinkinasen kann CK2 neben ATP auch GTP als Phosphatdonor verwenden. Die kinetischen Parameter des CK2-Holoenzymes und der CK2 α -Untereinheit unterscheiden sich. Bei der Verwendung von ATP und GTP sind die K_m -Werte für das Holoenzym niedriger als für die freie CK2 α -Untereinheit. Das wird durch die Beteiligung der CK2 β -Untereinheit bei der Bildung der optimalen Konfiguration der katalytischen Untereinheit bestätigt (Dobrowolska G., 1999). Im allgemeinen sind die K_m -Werte der CK2 und CK2 α in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen bei Verwendung von ATP niedriger, als bei der Verwendung von GTP. Im Gegensatz hierzu sind die K_m -Werte in Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen bei ATP-Zugabe höher als bei GTP. Die kinetischen Werte des Holoenzymes CK2 $\alpha'_2\beta_2$ zeigen keinen Unterschied bei der ATP- oder GTP-Bindung.

Mit Hilfe von Kristallstrukturen der binären Komplexe *mzCK2 α /AMPPNP* und *mzCK2 α /GMPPNP* wurde es möglich, die duale Co-Substrat-Spezifität dieser Proteinkinase zu erklären (Niefind K., et al., 1999). Alle Proteinkinasen der Ser/Thr/Tyr-Familie inklusive CK2 binden ATP durch die Bildung der Wasserstoffbrückenbindungen, die sich von den N1- und N6- Positionen des Adenin-Rings zu den Amid- und Carbonylgruppen der Peptidkette an

der Cofaktorbindungsstelle erstrecken.

Die Atome des GTP-Moleküls haben unterschiedliche von ATP-Atomen Wasserstoff-Donator- oder –Akzeptor-Eigenschaften, deshalb kann sich GTP nicht mit der gleichen Geometrie an CK2 α binden. CK2 α bindet dieses Nukleotid durch die Verschiebung der Purin-Base-Position entlang der Bindungsstelle, um die passenden Donator-Akzeptor-Wechselwirkungen zu schaffen. Zusätzlich leistet ein Wassermolekül einen Beitrag zur Wasserstoffbrückenbindung, was die Wechselwirkung zwischen C6 der Purin-Base von ATP und der Carbonylgruppe des Glu114 imitiert (Niefind K., et al., 1998). Die Spalte in der aktiven Stelle von CK2 ist ausreichend geöffnet, was die notwendige Verschiebung der Base und des Ribose-Rings zur Außenseite des Proteins ermöglicht. Die Unfähigkeit anderer Kinasen GTP-Moleküle zu binden, kann durch die veränderte Konformation der Bindungsstelle und/oder die möglichen sterischen Konflikte bei der Nukleotidverschiebung erklärt werden.

Eine andere signifikante Eigenschaft der CK2 ist ihre geringe Substratspezifität. Die Zahl der entdeckten Substrate von CK2 wächst sehr schnell. Die ersten Substrate wurden 1980 entdeckt. 1990 waren bereits 50 Substrate von CK2 bekannt (Abbildung 3). Das Repertoire der bekannten Substrate umfasst heute 307 Proteine. Abgesehen von einigen Ausnahmen, wird die Phosphorylierung *in vitro* durch das Auftreten der Phosphorylierung *in vivo* bestätigt (Pinna L.A., 2002). Bedeutend sind auch die Funktionen dieser Proteine in der Zelle. 60 Proteine sind Transkriptionsfaktoren, 50 beeinflussen die DNA/RNA-Struktur oder spielen eine Rolle bei der RNA-Synthese und der Translation. Auffällig ist auch die Zahl der Signal-Proteine. Von ihnen sind 80 Kalzium-bindende Proteine, Proteinkinasen oder Proteinphosphatasen. Überdies sind 40 virale Proteine als Substrate der CK2 entdeckt worden (Meggio F. & Pinna L.A., 2003).

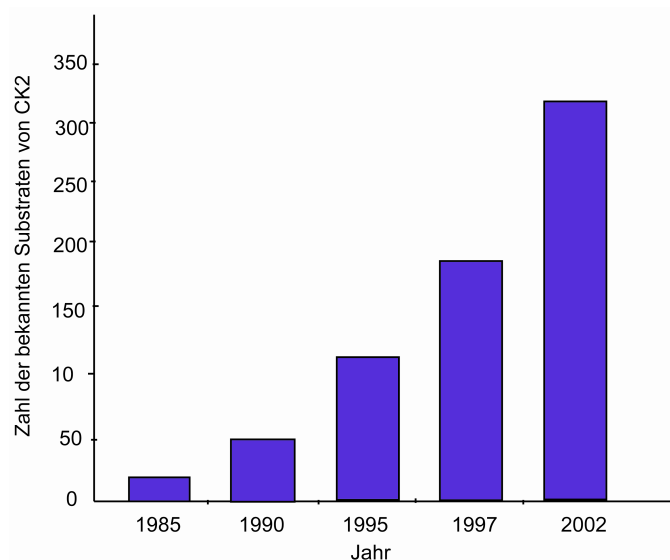


Abbildung 3: Die Entwicklung der Entdeckung von CK2-Substraten (Meggio F. & Pinna L.A., 2003)

Das folgende Motiv der Substratsequenz wird von der katalytischen Untereinheit CK2 α erkannt:

S/T-X-X-E/D

Hierbei repräsentieren Serin und Threonin die Reste, die phosphoryliert werden, und X stellt nicht basische Reste dar (Allende J.E. & Allende C.C., 1995). Es wurde auch über Tyrosin-Phosphorylierung der CK2 berichtet (Chardot T., et al., 1995; Wilson L.K., et al., 1997). Der phosphorylierte Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Rest kann den sauren Glutamat- oder Aspartat-Rest ersetzen (Pinna L.A., 2002).

Die CK2 ist sehr acidophil (Pinna L. A., 2003). Die typischen Phosphoakzeptor-Stellen (Serin, Threonin oder Tyrosin) sind durch mehrere saure Reste (im Durchschnitt > 5), die den Phosphoakzeptorrest umgeben, spezifiziert. Die sauren Aminosäurereste sind in allen Positionen zwischen $n-4$ und $n+7$ vorherrschend. Besonderes wichtig ist die Position $n+3$. Die sauren Aminosäurereste werden in 90% aller untersuchten Substratsequenzen in dieser Position und in allen Fällen, wo nur ein einziger saurer Rest detektiert wurde, gefunden. In 75% aller untersuchten Substrat-Sequenzen befindet sich der zweite wichtige saure Aminosäurerest in der Position $n+1$. Es ist bedeutsam, daß sich in jeder Substratsequenz mit einem fehlenden sauren Rest in der Position $n+3$ ein saurer Aminosäurerest in der Position $n+1$ befindet und *vice versa*. Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Substrate wurde festgestellt, daß die Aminosäurenresten Glutamat und Aspartat als saure Reste bevorzugt werden (Songyang Z., 1996).

Im Fall von PKA (cAMP-abhängige Proteinkinase) spielt Glu170 eine entscheidende Rolle bei der Erkennung des Substrats in der Position $n-2$. Bei der CK2 ist dieser saure Rest durch His160 ersetzt. Die Mutationen dieses Rests schädigen die Erkennung von Substraten, bei denen der bestimmende Faktor an der $n+3$ Stelle fehlt und die Phosphorylierung durch den sauren Rest der Stelle $n-2$ bestimmt wird (Dobrowolska G., et al., 1994). Die systematische Mutationsanalyse führte zur Identifizierung der grundlegenden Reste, die für die Wechselwirkungen mit den unterschiedlichen sauren bestimmenden Faktoren der Substrat-Sequenz wichtig sind (Sarno S., et al., 1996; Sarno S., et al., 1997). Diese Reste sind über alle CK2-katalytischen Untereinheiten aus verschiedenen Spezies hoch konserviert. Dazu gehören unter anderem die Cluster $K74-K77$, $K79-K83$ und $R191-R198$ -Loop. Der partielle oder komplette Austausch dieser CK2-Elemente durch andere Aminosäuren, beispielsweise durch Alanin führt zur Entstehung einer CK2-Mutante mit der reduzierten Substrat-Erkennung an den bestimmten Positionen der Substrat-Sequenz.

Die CK2-Fähigkeit zur Tyr-Phosphorylierung im Peptid-Substrat ist viel bescheidener im Vergleich mit der kanonischen Ser/Thr-Phosphorylierung. Und diese Fähigkeit ist abhängig von teilweise anderen strukturellen Besonderheiten als die, welche die Ser/Thr-Phosphorylierung bestimmen. Die Untersuchungen der Phosphorylierungsreaktion mit dem Tyr-phosphorylierten Fp3-Peptid geben viel höhere K_m - und viel niedrigere V_{max} -Werte als mit dem gleichen Fp3-Peptid, bei dem Tyrosin durch Serin ersetzt wurde. Die niedrigeren V_{max} -Werte sprechen dafür, daß das phosphorylierte Peptid sehr langsam die aktive Stelle von CK2 verläßt, was zur beachtlichen Produkt-Inhibierung führen könnte. Der Austausch der Aminosäure Glutamat in der Position $n+3$ durch Alanin unterdrückt praktisch die Ser-

Phosphorylierung, hat aber keinen Einfluß auf Tyr-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu ist der Asp-Austausch durch Alanin in der Position $n+1$, weniger der Isoleucin-Austausch durch Aspartat in der Position $n-1$, schädlich für die Tyr-Phosphorylierung im Gegensatz zur Ser-Phosphorylierung. Bei dem letztgenannten Austausch wird die Phosphorylierung des Ser-Fp3-Peptides sogar erhöht (Marin O., et al., 1999).

1.3.2 Potentielle Regulatoren von CK2

Heparin und 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) sind als Inhibitoren der CK2 bekannt (Hathaway G.M., 1982). Die Anwesenheit von 2,3-DPG in roten Blutkörperchen vermindert die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. Es gibt Hinweise, daß 2,3-DPG einige Enzyme in den Erythrocyten inhibiert (Roth E. Jr., 1990). Dies könnte die Schwierigkeiten beim Nachweis von CK2-Aktivität in gesunden Blutzellen im Vergleich zu der wesentlich höheren Aktivität in Leukämie-Zellen erklären (Phan-Dinh-Tuy F., 1985).

Ein weiterer wirksamer Inhibitor der CK2-Aktivität ist Heparin. Unterschiedliche biologische Aktivitäten wurden dem Heparin zugeschrieben. Unter anderem durch Konjugation zu Poly- β -aminoestern verursacht Heparin den Tod von Krebszellen durch Beeinflussung der Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren und die Induktion der Apoptose (Linhard R.J., 2004).

Es wurde kein inhibierender Effekt von Heparin auf andere Kinasen festgestellt. Es ist bekannt, daß zwei Cluster der CK2 α -Untereinheit - der Lysin-Kluster K74KKK77 und der Cluster R191, R195, K198 - an der Wechselwirkung mit Heparin beteiligt sind. Die inhibierende Eigenschaft des Heparins ist von seiner Länge abhängig. Ein Heparin-Fragment mit 22 negativen Ladungen erweist sich als optimal für die Inhibierung. Mutationen innerhalb der oben erwähnten CK2 α -Cluster reduzieren oder beseitigen die Heparin-Inhibierung vollkommen (O'Farrell F., 1999). Die inhibierende Wirkung von Heparin und 2,3-DPG beruht auf einem kompetitiven Mechanismus bezüglich des CK2-Substrats Kasein, während die ATP-Bindung unbeeinflusst bleibt (Hathaway G.M., 1982).

Eine weitere Gruppe von CK2-Inhibitoren sind ATP-kompetitive Inhibitoren. Dazu gehören beispielsweise Ribofuranosyl-benzimidazol-derivate (Meggio F., 1990) und tetrabromobenzotriazol-derivate (Battistutta R., 2001; Sarno S., 2001). Die Herstellung von CK2-Mutanten, die gegenüber diesen Inhibitoren insensitive sind, ist für die Abschätzung der Spezifität dieser Inhibitoren für CK2 *in vivo* hilfreich.

Polyamine (z.B. Putrescine, Spermidin, Spermin) sind organische Polykationen, die in Organismen weit verbreitet sind und eine regulatorische Funktion in unterschiedlichen biologischen Prozessen spielen. Diese Polyamine stimulieren die CK2-Aktivität (Verma R. & Chen K.Y.; 1997). Die Stimulation der Aktivität ist abhängig von der Mg^{2+} -Konzentration und der Natur des Substrats. Calmodulin kann durch die CK2 α -Untereinheit phosphoryliert

werden. Im Falle des CK2-Holoenzymes findet die Calmodulin-Phosphorylierung, aufgrund eines inhibierenden Effekts der CK2 β -Untereinheit nicht statt. Eine solche inhibierende Wirkung wird nur im Bezug auf Calmodulin beobachtet. Durch die Anwesenheit von Spermin wird diese inhibierende Wirkung der CK2 β -Untereinheit überwunden (Sarno S., 1993; Boldyreff B. & Issinger O.-G., 1999). Die optimale Spermin-Konzentration für die Aktivierung entspricht der physiologischen Sperminkonzentration. Die Spermin-Konzentrationen steigen bei der Zellteilung an. Dies könnte eine Voraussetzung für die Erhöhung der CK2-Aktivität *in vivo* sein (Allende J.E. & Allende C.C., 1995).

1.3.4 Physiologische Bedeutung

CK2 ist ein Protein, dessen Funktion in den Zellen sehr vielseitig ist. CK2 greift in den Zellzyklus zu unterschiedlichen Zeiten ein, vermutlich durch die Phosphorylierung wichtiger Zellzykluskomponenten. Wenn beispielsweise die CK2 α - und CK2 β -Untereinheiten in den sich teilenden Zellen phosphoryliert worden sind, wechselwirkt die phosphorylierte Form der CK2 mit Pin-1, einem unverzichtbaren Regulator der Zellteilung. Diese Beobachtungen unterstützen die regulatorische Funktion der CK2 in diesem Zellstadium (Litchfield D.W., 2003).

CK2 ist notwendig für das Überleben der Zellen. Der „Knock-out“ der katalytischen Untereinheit der CK2 ist tödlich in *Saccharomyces cerevisiae*. Anders ist es bei einem „Knock-out“ der regulatorischen CK2 β -Untereinheit. *S.cerevisiae* besitzt zwei verschiedene CK2 β -Untereinheiten. Der Ausfall einer der beiden regulatorischen Untereinheiten hat keine Auswirkung auf die Lebensfähigkeit und das Wachstum der Zellen außer einer stärkeren Empfindlichkeit gegenüber hohen Na⁺- und Li⁺-Konzentrationen. Der „Knock-out“ des CK2 β -Gens in *Schizosaccharomyces pombe* hat zur Folge, daß ein ernster Phänotyp zur Ausprägung kommt, welcher ein langsames Wachstum, Kälteempfindlichkeit und Anomalien in der Zellform aufweist. In männlichen Mäusen wird CK2 α' vorzugsweise im letzten Stadium der Spermatogenese produziert. Durch die Ausschaltung der CK2 α' -Gene wird die Zahl der apoptotischen Zellen erhöht. Die Folge ist Unfruchtbarkeit, verschuldet durch fehlerhafte Spermatogenese. Das weist auf die einzigartige Funktion dieser CK2 α -Isoform hin. Der „Knock-out“ des CK2 β -Genes bei Mäusen führt dazu, daß die Embryonen sich *in vivo* zwar bis zum Blastula-Stadium entwickeln können, aber kurz nach der Implantation sterben. In *vitro*-gebildete Embryonen mit dem „Knock-out“-Gen degenerieren bald nach der Freisetzung aus der *Zona Pellucida* (Buchou T., et al., 2003).

Es gibt Hinweise, daß CK2 als Regulator der Apoptose auftreten kann. Der programmierte Zelltod oder die Apoptose ist ein wichtiger Teil der Zellphysiologie, und die Regulation der Apoptose ist ein kritischer Faktor bei der Onkogenese. Untersuchungen an der Prostata, einem androgen-abhängigen Organ, zeigen, daß ein Androgen-Verlust mit dem Verlust von

nuklear lokalisierter CK2 begleitet ist. Dies ist mit der Beendigung des Zellwachstums und der Induktion der Apoptose verbunden. Bei der Stimulierung durch Androgene und/oder andere Wachstumsfaktoren trifft der CK2-Transport zum Kern mit der Beendigung der Apoptose und der Zunahme des Wachstums zusammen (Unger G.M, et al., 2004).

Die Überexpression der katalytischen CK2 α -Untereinheit oder des Holoenzymes wirkt anti-apoptotisch, andererseits hat die Überexpression der regulatorischen CK2 β -Untereinheit keinen abwehrenden Effekt gegen die Apoptose. Der Mechanismus der abwehrenden Funktion von CK2 α ist noch nicht klar, allerdings kann die Rolle der Phosphorylierung von bestimmten nuklearen Substraten nicht ausgeschlossen werden (Guo C., et al., 2001). CK2 β hat eine zentrale Rolle in der Bildung des CK2-Komplexes und nimmt an der Regulierung der katalytischen Aktivität und der Substratspezifität teil. Die Überexpression der CK2 β -Untereinheit führt zur Erhöhung der CK2-Aktivität. Es wurde gezeigt, daß die Änderungen in der Phosphorylierung/Dephosphorylierung der CK2 β -Untereinheit der erhöhten CK2-Expression in der Krebszellen zugrunde liegen könnten (Zhang C., et al., 2002).

In allen untersuchten menschlichen Karzinomen wurde gefunden, daß die CK2-Aktivität erhöht ist. Bei den Untersuchungen von Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu gesunden ipsilateralen Organen wurde festgestellt, daß die durchschnittliche CK2-Aktivität in 21 unterschiedlichen Nieren-Proben 316 U/mg und in den entsprechenden Tumoren – 610 U/mg betrug. Das Verhältnis der einzelnen Untereinheiten in den Tumor gegenüber der gesunden Geweben (T/g war für die CK2 α 1.58 und für CK2 β – 2.65. Das alles spricht dafür, daß die Erhöhung von CK2-Aktivität in den Tumorzellen eine Folge der Deregulierung der Biosynthese der einzelnen Untereinheiten oder der Degradation sein kann (Guerra B. & Issinger O.-G., 1999). In menschlichen Mammakarzinomen zeigte die Immunohistochemie eine reichliche Überexpression der katalytischen Untereinheiten. Die CK2-Aktivität in den untersuchten Proben war zehnfach höher als in den gesunden Organen.

Zur Bestimmung des Einflusses der CK2-Überexpression auf die Entstehung von Brusttumoren wurden Untersuchungen mit transgenen Mäusen durchgeführt. Es wurde festgestellt, daß die CK2 α -Überexpression in den Brustdrüsen der transgenen Mäusen die Fehlbildung und die Hyperplasie (Größenzunahme eines Gewebes oder Organs nur durch Zellvergrößerung bei normal bleibender Zellzahl und -struktur) verursacht (Landesmann-Bollag E., et al., 2001). Bei der Hemmung der CK2-Expression *in vivo* durch Injektion von „*antisense*“ RNA gegen CK2 α in Prostata-Tumore wurde die Tumorgroße auf 30 – 40% innerhalb von 7 Tagen nach der zweiten Behandlung reduziert. Wurde die „*antisense-Dosis*“ von 2.5 μ g auf 10 μ g erhöht, wurde die Tumorgroße um 95% reduziert. Diese Befunde deuten auf die effektive Induzierung der Apoptose schon durch eine kleine Dosis von CK2 α -spezifischer Antisense-RNA hin (Unger G.M, et al., 2004; Wang H., et al., 2001).

1.3.5 Bekannte Strukturen der Proteinkinase CK2 und ihre Bedeutung

Bisher konnten 18 unterschiedliche CK2-Strukturen gelöst werden. Einige von ihnen sind in der folgenden Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Einige publizierte Kristallstrukturen der Proteinkinase CK2.

Protein	Organismus	Liganden	Referenz
<i>zmCK2α</i>	Mais	AMPPNP + 2Mg^{2+}	Niefind K., et al., 1999
<i>zmCK2α</i>	Mais	GMPPNP + 2Mg^{2+}	Niefind K., et al., 1999
<i>zmCK2α</i>	Mais	Benzamidin (vermutlich)	Niefind K., et al., 1998
<i>zmCK2α</i>	Mais	<i>hsCK2β</i> ¹⁸¹⁻²⁰³ + AMPPNP + 2Mg^{2+}	Battistutta R., et al., 2000 ^a
<i>zmCK2α</i>	Mais	Emodin	Battistutta R., et al. 2000 ^b
<i>zmCK2α</i>	Mais	4,5,6,7-Tetrabromo-2-benzotriazol (TBB)	Battistutta R., et al., 2001
<i>zmCK2α</i>	Mais	1,8-Dihydroxy-4-nitro-antrachinon	De Moliner E., et al., 2003
<i>zmCK2α</i>	Mais	1,8-Dihydroxy-4-nitro-xanthen-9-on	De Moliner E., et al., 2003
<i>zmCK2α</i>	Mais	5,8-Diamino-1,4-dihydroxy-antrachinon	De Moliner E., et al., 2003
<i>zmCK2α</i>	Mais	[5-Oxo-5,6-dihydroindolo-(1,2-a)guinazolin-7-yl)-Essigsäure	Sarno S., et al., 2003
<i>hsCK2β</i> ¹⁻¹⁸²	Mensch	-----	Chantalat L., et al., 1999
CK2-Holoenzym (<i>hsCK2α</i> ²⁻³³⁷ und <i>hsCK2β</i>)	Mensch	AMPPNP	Niefind K., et al., 2000

Jede der gelösten CK2-Strukturen hat einen Beitrag zum besseren Verständnis der Funktionen und unikalen Eigenschaften von Proteinkinase CK2 geleistet. Beispielsweise erlauben die Strukturen der *zmCK2α* im binären Komplex mit AMPPNP/ Mg^{2+} oder mit GMPPNP/ Mg^{2+} zu erklären, wie die Proteinkinase CK2 einige strukturelle Einschränkungen, die in der Struktur mit AMPPNP oder ATP beobachtet wurden und die die Bindung von GTP unmöglich machten, überwindet und GTP oder GMPPNP verwenden kann (Niefind K., et al., 1999).

Die Struktur von *zmCK2α* mit 4,5,6,7-Tetrabromo-2-benzotriazol (TBB) hilft die selektive Wirkung dieses Inhibitors auf CK2 zu verstehen. Es wurde festgestellt, daß die Hauptwechselwirkungen zwischen TBB und CK2α hydrophob sind und einige geringere

Konformationsänderungen beim Eintritt des TBBs in die relativ kleine Bindungstasche mit drei großen hydrophoben Aminosäurenresten verursachen. Der Verlust des inhibierenden Effekts von TBB auf andere Proteinkinasen kann durch die Anwesenheit einer wesentlich größeren, hydrophoben Tasche erklärt werden. In solch großen Bindungstasche befindet sich der Inhibitor nicht permanent, sondern er kann sich frei nach außen und nach innen bewegen (Battistutta R., et al., 2001).

Die Lösung der Kristallstruktur der *hsCK2 β* -Untereinheit ist eine gute Bestätigung der dimeren Konformation dieses Proteins. Es wurde festgestellt, daß die meisten Wechselwirkungen zwischen beiden CK2 β -Monomeren an den zwei Stellen von dem Zn-Bindungsmotiv: Cys109–X4–Cys114 Element und β 3-Strang stattfinden. Es wurde gezeigt, daß Mutationen an diesen Stellen kritisch für die CK2 β -Dimer-Bildung sind. Nach den Mutationen befindet sich das Protein im monomeren Zustand (Chantalat L., et al., 1999).

Mit der Lösung der *hsCK2*-Holoenzym-Struktur wurde bewiesen, daß einige frühere Annahmen über die CK2-Holoenzym-Konformation völlig falsch waren. Es wurde beispielsweise festgestellt, daß die regulatorischen Untereinheiten ein stabiles Dimer im Holoenzym bilden, das mit zwei katalytischen CK2 α -Untereinheiten verbunden ist. Die CK2 α -Untereinheiten stehen in keinem direkten Kontakt miteinander. Mit der Hilfe von dieser Struktur wurde auch entdeckt, daß die beiden CK2 α -Untereinheiten unterschiedliche Bindungsaffinitäten für die Co-Substrate haben, denn die gebundenen AMPPNP-Moleküle wurden nur an einer von beiden katalytischen Untereinheiten gebunden gefunden (Niefind K., et al., 2000).

1.4. Ziele der Arbeit

Diese Arbeit schließt sich an frühere Röntgenstrukturanalysen von CK2 α aus Mais (Niefind K., et al., 1998), von binären Komplexen aus Mais-CK2 α und AMPPNP bzw. GMPPNP (Niefind K., et al., 1999) und vom CK2-Holoenzym aus *Homo sapiens* (Niefind K., et al., 2001) an. Bei jenen Arbeiten waren einige Fragestellungen offen geblieben, andere haben sich neu ergeben:

Wie werden Protein- und Peptidsubstrate vom Enzym erkannt und gebunden? Anders ausgedrückt: Auf welchen strukturellen Grundlagen beruht die Substratspezifität von CK2?

Läßt sich die markante duale Cosubstratspezifität von CK2, d.h. die Fähigkeit, sowohl ATP als auch GTP als Cosubstrat verwenden zu können, noch besser verstehen und durch rationales Protein-Design beeinflussen?

Wie thermostabil sind CK2 α und CK2 β , und wodurch läßt sich die Thermostabilität dieser Proteine beeinflussen?

Wie groß ist die Stabilität des CK2-Holoenzym? Lassen sich die seit etwa 10 Jahren gesammelten Indizien, daß CK2 α und CK2 β auch physiologische Funktionen haben, die nicht an das Holoenzym gebunden sind, strukturell und thermodynamisch erhärten?

Mit diesen Fragen werden die zentralen Zielsetzungen dieser Arbeit benannt. Auf sie wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

2 Theoretische Grundlagen der ausgewählten Methoden

2.1 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

2.1.1 Beschreibung des Gerätes

Die *Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)* ist die direkteste Methode, um die Wärmeänderung bei der Bildung eines Proteinkomplexes bei einer konstanten Temperatur zu messen. Das Titrationsexperiment wird ausgeführt, indem ein Bindungspartner („*titrant*“ oder L) zum anderen Bindungspartner („*titrand*“ oder M) in die Messzelle des Kalorimeters titriert wird. Nach jeder Injektion eines kleinen Volumens des Ligandes wird die freigegebene oder absorbierte Wärme in der Messzelle in Bezug auf die Referenzzelle gemessen, die mit Wasser gefüllt ist. Die beiden Zellen befinden sich in einem adiabatischen Mantel. Die Addition des Ligandes ist automatisiert und erfolgt computer-gesteuert aus einer hochpräzisen Spritze, mit der der Inhalt der Messzelle für die schnellere Vermischung der Reaktanten umgerührt wird.

Die Messung der Wärme ermöglicht die Bestimmung der *Bindungskonstante* (K_a), der *Reaktionsstöchiometrie* (n), der *Enthalpie* (ΔH) und der *Entropie* (ΔS), da das komplette thermodynamische Profil der molekularen Wechselwirkungen in einem einzigen Experiment erfasst wird. Führt man die ITC-Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen aus, so kann man obendrein die *Änderung der Wärmekapazität* (ΔC_p) ermitteln.

Das Gerät kann exo- und endotherme Reaktionen verfolgen. Bei einer exothermen Reaktion wird Reaktionswärme freigesetzt, d.h. der Inhalt der Messzelle wird im Vergleich zur Referenzzelle erwärmt. Um die Temperaturdifferenz zwischen beiden Zellen auszugleichen, muß der Heizstrom für die Messzelle verringert werden, so dass sich ein negatives Signal ergibt. Läuft eine endotherme Reaktion ab, wird durch die Reaktion Wärme verbraucht und es entsteht ein Wärmedefizit in der Zelle. Der Heizstrom der Messzelle muss erhöht werden. Das Messignal ist in diesem Fall positiv.

2.1.2 Durchführung der ITC- Messungen

Die Pufferauswahl ist sehr wichtig bei der Planung eines ITC-Experimentes. Wenn bei der Bildung des Komplexes Protonen aufgenommen oder abgegeben werden, muß die äquivalente Anzahl an Protonen vom Puffer aufgenommen oder in diesen abgegeben werden. Hat der ausgewählte Puffer eine große Ionisationsenthalpie, so wird die gemessene Enthalpie nicht nur von der Bildung des Komplexes, sondern auch von der Ionisation des Puffers abhängig sein.

Sowohl das Protein als auch der Ligand müssen in denselben Pufferlösungen vorgelegt werden (identische pH-Werte, Zusammensetzung und Konzentrationen der gelösten Stoffe). Ist dies nicht der Fall, kann die Mischenthalpie der verschiedenen Lösungen in der Messzelle viel größer als die Funktionsenthalpie sein, die durch die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein entsteht. Es wird empfohlen die beiden Wechselwirkungspartner gründlich gegen den gleichen Puffer zu dialysieren.

Die Makromolekül- und die Titratlösungen müssen filtriert oder zentrifugiert werden, um unerwünschte Schwebstoffe zu entfernen. Sofort vor der Messung müssen die beiden Lösungen durch Rühren unter Vakuum entgast werden, um Luftblasen zu verhindern und um physikalisch gelöste Gase zu entfernen, da kleinste Mengen Luft bei der Messung stören und zu einer unregelmäßigen Grundlinie führen.

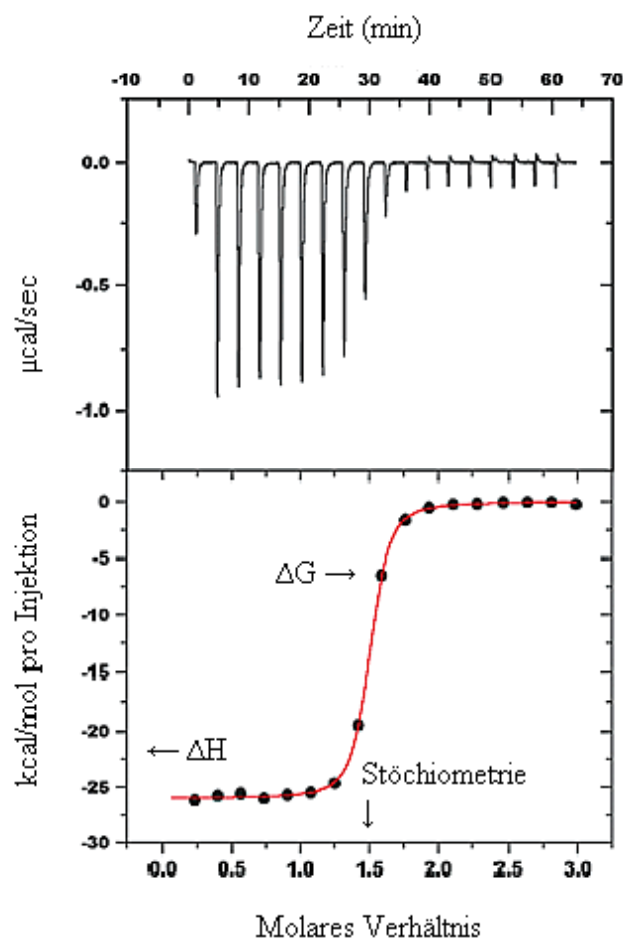


Abbildung 4: Ergebnis einer ITC-Messung. Die obere Hälfte zeigt die Rohdaten einer typischen ITC Messung. Jeder Peak entspricht einer Injektion. Die Messpunkte in der unteren Hälfte der Abbildung sind jeweils das Integral der obigen Peaks. Die durchgezogene Kurve repräsentiert das Ergebnis der Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Der Achsenabschnitt auf der Ordinate repräsentiert die Bindungsenthalpie ΔH . Aus dem Kurvenverlauf lässt sich die Freie Bindungsenthalpie ΔG und somit auch die Bindungskonstante K bestimmen.

2.1.3 Datenanalyse

2.1.3.1 Bindungsaffinität

Die reversible Bindung zwischen einem Protein P und einem Liganden L zum Komplex PL wird im thermodynamischen Gleichgewicht durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben:

$$K = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad \text{für } P + L \xrightleftharpoons{K} PL \quad (1)$$

Die Gesamtkonzentration $[L]_{\text{tot}}$ des Liganden in der Zelle ist die Summe aus der Konzentration des Liganden L in ungebundener Form und der Konzentration $[PL]$ des Komplexes. Entsprechend ist die Gesamtkonzentration $[P]_{\text{tot}}$ die Summe aus den Konzentrationen des freien Proteins $[P]$ und des Komplexes $[PL]$.

$$[P]_{\text{tot}} = [P] + [PL] \quad (2)$$

$$[L]_{\text{tot}} = [L] + [PL] \quad (3)$$

Die freigesetzte oder bei der Titration absorbierte Wärme Q ist abhängig von dem Zellvolumen V , den Konzentrationen, der molaren Bindungsenthalpie ΔH , der Stöchiometrie und der Menge des zugespritzten Liganden. Die Änderung dQ der Wärmemenge Q ist proportional zur Änderung der Konzentration $[PL]$.

$$dQ = d[PL] \cdot \Delta H \cdot V \quad (4)$$

Der experimentelle Parameter, den man aus einer Messung mit dem Titrationskalorimeter bestimmt, ist die differenzielle Wärme $dQ/d[L]_{\text{tot}}$. Dieser Wert hängt sowohl von der absoluten Konzentration $[P]_{\text{tot}}$ des Proteins in der Messzelle ab, als auch vom Wert der Gleichgewichtskonstanten K und von der Gesamtkonzentration $[L]_{\text{tot}}$ des Liganden in der Messzelle.

Zur Bestimmung der Bindungskonstante müssen die Konzentrationen der beiden wechselwirkenden Partner sehr genau eingestellt sein. Die experimentelle Bindungsisotherme kann durch den Wert c - das ist das Produkt der Bindungskonstante K_a (Assoziationskonstante), der Proteinkonzentration $[P]$ und der Stöchiometrie n der Reaktion charakterisiert werden.

$$C = K_a \cdot [P] \cdot n \quad (5)$$

Für eine genaue Bestimmung der Bindungskonstante K_a wird ein c -Wert von 1 bis 1000 empfohlen. Für relativ starke Ligandenbindung mit $c = 5$ bis 500 erhält man eine sigmoidale Kurve, deren Verlauf stark vom Parameter c abhängt. Schwache Bindungen ergeben fast horizontale Bindungskurven ($c < 5$), die nur wenig Informationen über die Bindungskonstante K_a enthalten. Bei einer starken Bindung ($c \rightarrow \infty$) des Ligandes L an das Protein P werden alle Moleküle des Liganden sofort gebunden, bis die Sättigung des Proteins eintritt, d.h. dass

alle Bindungsstellen besetzt sind. Als Bindungskurve ergibt sich dann eine Stufenfunktion mit der Höhe ΔH . Für sehr starke Bindungsreaktionen sind die optimalen Konzentrationen zu klein um messbare Wärmeänderungen zu ergeben. Aus diesem Grunde kann ein K_a von mehr als ca. 10^9 M^{-1} mittels der ITC nicht genau gemessen werden. Sehr feste Bindungen können jedoch mittels DSC-Messungen analysiert werden, was in dem Kapitel 2.2 „Differentialrasterkalorimetrie“ diskutiert wird. Simulierte Bindungskurven sind in der Abbildung 5 dargestellt.

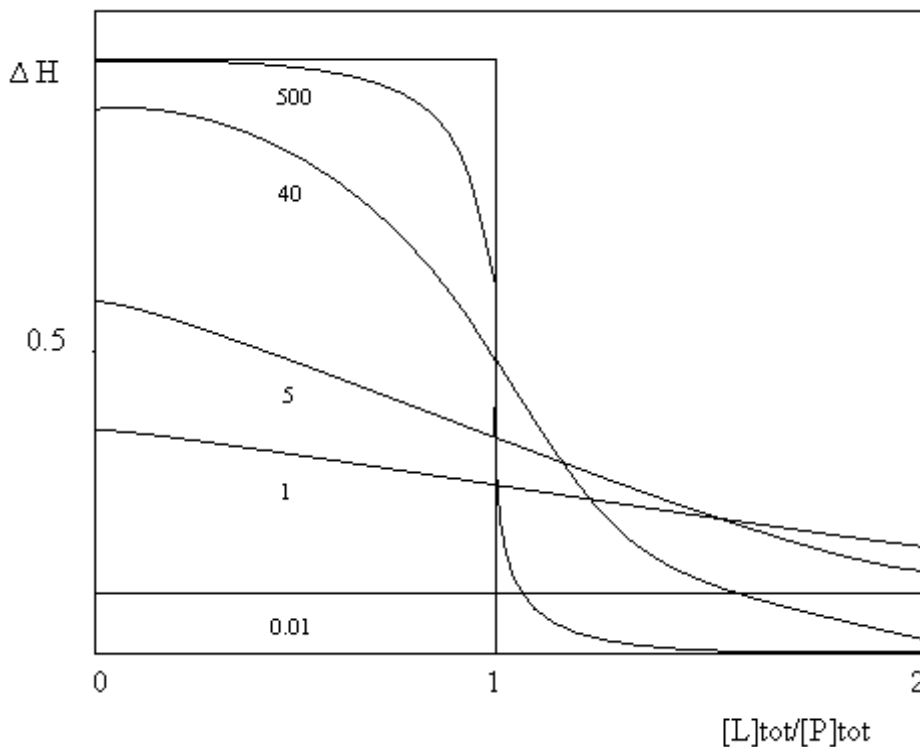


Abbildung 5: Simulierte Bindungsisothermen nach Gleichung für verschiedene Parameter $c = n \cdot K_a \cdot [P]_{\text{tot}}$. Die Werte für c sind in der Abbildung angegeben.

2.1.3.2 Enthalpie

Nur durch die ITC-Methodik kann die Interaktionswärme unmittelbar bestimmt werden. Mit nicht-kalorimetrischen Methoden dagegen ist es zur Bestimmung der Enthalpieänderung nötig, zahlreiche Experimente durchzuführen und anschließend die Temperaturabhängigkeit der Bindungskonstanten K_a durch die van't Hoffsche Reaktionsisochore zu analysieren:

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H_{\text{VH}}}{RT^2} \quad (6)$$

mit K : Gleichgewichtskonstante, T : absolute Temperatur und R : Gaskonstante.

Obgleich ΔH_{VH} und ΔH gleich sein sollen, gibt es mehrere experimentelle Beispiele, in denen Abweichungen aufgetreten sind. Für derartige Unterschiede gibt es verschiedene Gründe.

Zu einer Enthalpieänderung, die man durch ITC misst, trägt das ganze System bei. Das heißt, gemessen wird die Gesamtwärme, die in der kalorimetrischen Zelle bei jeder Addition des Liganden freigegeben oder absorbiert wird. Dies beinhaltet sowohl die

Wechselwirkungen zwischen den reagierenden Molekülen als auch weitere Prozesse wie z.B. konformative Änderungen, Ionisierung von polaren Gruppen und Wechselwirkungen mit anderen Pufferkomponenten.

Auch die um Mischungseffekte korrigierte Wärmeänderung ist noch aus verschiedenen Beiträgen zusammengesetzt. Die molare Enthalpieänderung ist nur noch abhängig vom Eingangs- und Endzustand der Bindungsreaktion, von den solvatisierenden freien Molekülen und dem endgültigen, solvatisierten Komplex.

2.1.3.3 Vergleich zwischen ITC und Oberflächenplasmonresonanz

Die Oberflächenplasmonresonanz („*Surface plasmon resonance*“ oder „*SPR*“) ist ebenfalls eine oft verwendete Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten. Im Vergleich zu ITC-Messungen, bei denen die Bindung in der Lösung stattfindet, ist bei der SPR ein Makromolekül an der Oberfläche eines Trägers befestigt, während der zweite Wechselwirkungspartner mobil ist und vorbei fließt. Obwohl die Bindung am fixierten Molekül stattfindet, passiert dies nahe der Oberfläche und beinhaltet so eventuell zusätzliche Wechselwirkungen. In der Tabelle 2 ist ein Vergleich der beiden Methoden dargestellt.

Tabelle 2: Vergleich der ITC- und SPR-Methoden.

Eigenschaft	ITC	SPR
Fixierung	Keine Fixierung oder chemische Modifizierung; Eventuell Lösungsmittelabhängigkeit	Ein Reaktant ist fixiert und chemisch modifiziert; Abhängigkeit von Oberfläche und Lösungsmittel
Ergebnisse	Untersuchung der unveränderten Moleküle in Lösung bei der direkten Bestimmung der K_b	Fixierung kann zu anomaler Bindung führen
Molekulargewichtabgrenzung	Keine Einschränkungen im Molekulargewicht	Limit < 200Da Empfindlichkeit sinkt bei geringerem Molekulargewicht
Abgeleitete Daten	Bindungskonstante (K_b), Stöchiometrie (n), Enthalpie (ΔH), Entropie (ΔS)	Bindungskonstante (K_b)

2.2 Differentialrasterkalorimetrie

Die DSC (*“differential scanning calorimetry“*) wird in der experimentellen Biochemie verwendet, um die Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität von Makromoleküllösungen zu messen. Diese Technik wird oft zur Bestimmung der *Entfaltungstemperatur* (T_m) eines Makromoleküls angewendet. Obendrein kann man die *Wärme* (d.h. die *Enthalpie* ΔH) ermitteln, die mit dieser Umwandlung verbunden ist.

2.2.1 Durchführung der DSC- Messungen.

Im Verlaufe einer DSC-Messung wird die Temperatur der Probe systematisch erhöht (up-scans) oder gesenkt (down-scans) und dabei die Wärmekapazität gemessen. Deutliche Änderungen der Wärmekapazität ergeben sich immer dann, wenn es zu Phasenübergängen bei den hochkooperativen Strukturen in der Probe kommt, z.B. durch Konformationsänderungen, Schmelzen, Hydratation/Dehydratation, Aggregation/Deaggregation oder Kombination mehrerer dieser Faktoren. Moleküle mit kleinem Molekulargewicht dagegen zeigen im allgemeinen keine derartigen Phasenübergänge, es sei denn, sie bilden aggregierte molekulare Strukturen infolge von intermolekularen Wechselwirkungen.

Das DSC-Gerät besteht aus jeweils einer wärmeisolierten (adiabatischen) Referenz- und einer Probenzelle. Der Puffer in der Referenzzelle muß identisch mit demjenigen in der Probenzelle sein. Beiden Zellen wird Wärmeenergie zugeführt, und entsprechend der Wärmekapazität heizen sie sich unterschiedlich schnell auf. Damit die Temperatur der Zellen gleich bleibt, muß eine von ihnen stärker geheizt werden. Die Differenz der zugeführten elektrischen Energie dient als Maß für die Wärmekapazität ΔC_p der Probe.

Die Reinheit der Probe bei der Untersuchung muß so groß wie möglich und die Konzentration der Probe sehr genau bestimmt sein. Die Lösungen müssen vor den Messungen entgast werden, um die Bildung von Luftblasen bei steigender Temperatur zu vermeiden. Die Abbildung 6 zeigt eine typische DSC-Kurve.

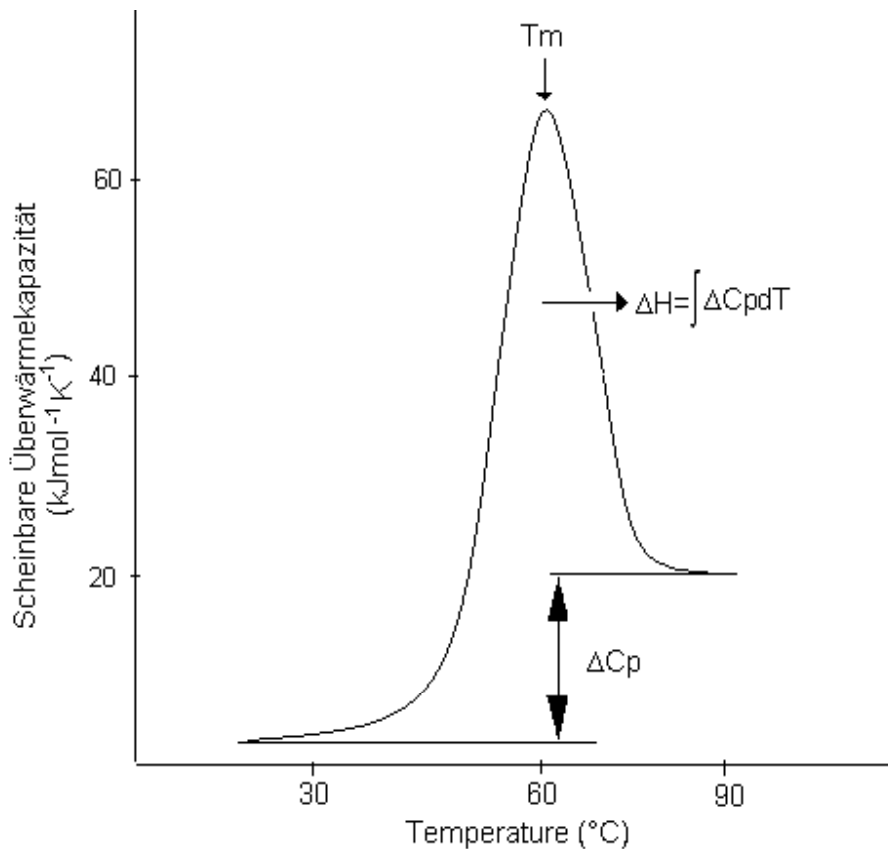


Abbildung 6: Ein typisches DSC-Spektrum.

Die Form und die Fläche der hier gezeigten, endothermen Übergangskurve enthalten die thermodynamische Information über den Umwandlungsprozess. Die integrierte Fläche unter dem Peak, bezogen auf die Stoffmenge des Proteins in der Messzelle, ist ein Maß für kalorimetrische Enthalpie (Hcal/mol) des Übergangs. Die Temperatur am Peakmaximum (T_m) ist der Punkt, an dem durchschnittlich 50% der Proteinmoleküle entfaltet sind. Form und Höhe des Peaks werden also durch die Anzahl und die Energiezustände der Proteinkonformationen bestimmt. Ausgeprägte Konformationsänderungen machen sich oft im Auftreten von mehreren Gipfeln bemerkbar.

2.2.2 Informationsgehalt der DSC- Daten

2.2.2.1 Partielle spezifische Wärmekapazität

Die Temperaturabhängigkeit der spezifischen Wärmekapazität enthält Informationen über den konformativen Zustand des Proteins in dem gemessenen Temperaturintervall. Die partielle spezifische Wärmekapazität des nativen Proteins ist wesentlich niedriger als die des denaturierten Proteins. Wenn die Probe aufgeheizt wird, folgt $C_p(T)$ einem gipfförmigen Verlauf, sofern die Proteindenaturierung kooperativ ist. Die Fläche unter dem Peak entspricht der Wärme, die während des Entfaltungsprozesses absorbiert wird (Abbildung 6). Die

Anwesenheit von nur einem Peak deutet an, daß der Entfaltungsübergang kooperativ ist. Dies bedeutet die Anwesenheit zweier Zustände: des nativen (gefalteten) Zustands und des denaturierten (entfalteten) Zustands. Das Protein denaturiert innerhalb des Temperaturintervalls von T_1 bis T_2 mit dem Übergang im Maximum. Die Zunahme der Wärmekapazität, die die Proteindenaturierung begleitet, wird bestimmt als:

$$\Delta C_p^{\text{den}} = \langle C_{p,D}(T) \rangle - \langle C_{p,N}(T) \rangle \quad (7)$$

Der Wert ist positiv, denn das denaturierte Protein hat, wie bereits oben erwähnt, immer eine höhere Wärmekapazität als das native Protein. Die positive Wärmekapazität der Denaturierung ist vor allem eine Folge der steigenden Freiheitsgrade nach der Zersetzung der kompakt gefalteten Konformation.

2.2.2.2 Freie Energie

Proteine sind Makromoleküle, deren Strukturen sich im Minimum der Freien Energie bei einer bestimmten Temperatur befinden. Die Zustandsfunktion Q repräsentiert die Summe aller statistischen Proteinzustände:

$$Q = 1 + \sum_{i=1}^{N-1} e^{-\frac{\Delta G_i}{RT}} + e^{-\frac{\Delta G_N}{RT}} \quad (8)$$

wobei Q eine Zustandsfunktion, N die Zahl der zugänglichen Zustände, ΔG_i die Energie des i -ten Zustandes, R die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur sind. Zustände mit höherem negativem ΔG -Wert sind bevorzugt. Also werden bestimmte molekulare Konformationen ungünstig, wenn die Temperatur der Lösung zunimmt, denn ihre Gibbs-Energie wächst. Dies kann zu ungünstigen Enthalpie- oder Entropie-Beiträgen führen. Die Größe der Enthalpiedifferenz zwischen zwei Konformationszuständen bestimmt die Schnelligkeit, mit der zwischen beiden Konformationszuständen bei einer bestimmten Temperatur gewechselt wird, was durch den Gibbs-Helmholtz-Ausdruck beschrieben wird:

$$\left(\frac{\partial \Delta G_i / T}{\partial T} \right)_p = - \frac{\Delta H_i}{T^2} \quad (9)$$

2.2.2.3 Kalorimetrische Enthalpie und Van't Hoffs Enthalpie

Die kalorimetrische Enthalpie ΔH_{cal} ist eine wichtige und charakteristische Größe des Überganges. Sie repräsentiert eine genaue kalorimetrische Zuordnung der Denaturierungsenthalpie und ist unabhängig von der Form der Übergangskurve zwischen den Temperaturen T_1 und T_2 .

Demgegenüber ist die Van't Hoffsche Enthalpie ΔH_{VH} modellabhängig, d.h. sie wird durch die Form des Transitionspeaks bestimmt. Je schärfer ein Peak, desto grösser ist ΔH_{VH} und

umgekehrt. Für das Modell mit zwei Zuständen („*two-state*“) ist die Änderung der molaren Van't Hoff'schen Enthalpie gleich der Änderung der Enthalpie pro Mol der kooperativen Einheit. Das Modell „*two-state*“ geht davon aus, daß ein thermodynamisches Gleichgewicht zwischen zwei experimentell unterscheidbaren Zuständen



und ohne Zwischenzustände vorliegt.

Das Verhältnis von ΔH_{cal} und ΔH_{VH} kann manchmal Erkenntnisse bringen, die nicht durch ΔH_{cal} allein zugänglich sind.

$$\Delta H_{\text{VH}} = \frac{4RT_m^2 \langle \Delta C_p \rangle_{\text{tr, max}}}{\Delta H_{\text{cal}}} \quad (10)$$

wobei R die allgemeine Gaskonstante und $\langle C_p \rangle_{\text{tr, max}}$ die gemessene Wärmekapazität beim Peak-Maximum sind. Das Verhältnis $\Delta H_{\text{VH}} / \Delta H_{\text{cal}}$ liefert Informationen über die Zahl der Moleküle, die miteinander während des Übergangs wechselwirken. Wenn das Verhältnis $\Delta H_{\text{VH}} / \Delta H_{\text{cal}} = 1$ ist, so kann man daraus schlußfolgern, daß die Denaturierung über zwei Zustände erfolgt. Ein Verhältnis > 1 ist ein Hinweis darauf, daß es signifikante Zwischenzustände gibt. In diesem Falle bekommt man keine symmetrische Übergangskurve. Ein Verhältnis < 1 weist auf einen irreversiblen Prozess hin.

2.2.2.4 Ligandenbindung

Mit DSC kann auch untersucht werden, welche Rolle Liganden bei der Stabilisierung eines Proteins spielen. Wenn sich ein Ligand mit hoher Affinität an ein Protein bindet, wird sich die Wärmekapazität des resultierenden Komplexes von denjenigen des isolierten Proteins und des isolierten Liganden unterscheiden.

Wenn die gegenseitige Stabilisierung der Bindungspartner in dem Komplex sehr hoch ist, ist die Dissoziation des Komplexes sehr fest an die Denaturierung seiner Komponenten gekoppelt. Das Ergebnis ist ein einziger Peak auf dem Thermogramm, der bei höherer Temperatur als die Schmelztemperaturen der einzelnen Komponenten liegt.

Die Daten aus den DSC-Messungen können zur Bestimmung sehr hoher Bindungskonstanten (bis zu $10^{20} - 10^{40} \text{M}^{-1}$) verwendet werden, die durch andere Methoden nicht mehr zugänglich sind (Brandts, J.F. & Lin, L.-N.; 1990). Bei Reaktionen mit 1:1-Stöchiometrie versagen die meisten Methoden in einem Bereich oberhalb von $10^5 - 10^7 \text{M}^{-1}$. Bei der ITC-Methode müssen so z.B. die Arbeitskonzentrationen des Proteins und des Liganden verringert werden, je höher die Bindungskonstanten sind, so daß schließlich eine

Grenze der Detektionsempfindlichkeit erreicht wird. Mit ITC können daher nur Bindungskonstanten bis maximal $10^6 - 10^{11} \text{M}^{-1}$ einigermaßen verlässlich bestimmt werden. Die Oberflächenplasmonresonanz-Methode funktioniert nur bei solchen Bindungskonstanten gut, die im Bereich $10^4 - 10^{11} \text{M}^{-1}$ liegen. Bindet ein Ligand (ein kleines Molekül oder ein anderes Protein) bevorzugt an die native Form des Proteins, so stabilisiert er diesen nativen Zustand. Mit steigender Ligandenkonzentration wird somit die Entfaltung des Proteins schrittweise weniger günstig, d.h. die Schmelztemperatur steigt. Wenn sich umgekehrt der Ligand vorzugsweise an das entfaltete Protein bindet, wird die Entfaltung unterstützt, so daß die Schmelztemperatur sinkt.

Vorausgesetzt, daß sich der Ligand ausschließlich an die native und gefaltete Form des Proteins bindet und daß die Übergänge zwischen gefalteter und ungefalteter Form reversibel sind, kann die Bindungskonstante für die Protein-Ligand-Wechselwirkung aus den Schmelztemperaturen des Proteins in Anwesenheit und in Abwesenheit des Liganden sowie aus ΔH und ΔC_p für den Übergang bestimmt werden:

$$K_b(T_m) = \frac{e^{\left[-\frac{\Delta H^\circ}{nR} \cdot \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T^\circ} \right) + \frac{\Delta C_p}{nR} \cdot \left(\ln \frac{T}{T^\circ} + \frac{T}{T_m} - 1 \right) \right]}}{[L]_{T_m}} \quad (11)$$

In dieser Gleichung sind: T° die Schmelztemperatur in Anwesenheit des Liganden, T_m die Schmelztemperatur in Abwesenheit des Liganden, $K_b(T_m)$ die Bindungskonstante bei T_m , ΔH° und ΔC_p die Enthalpieänderung und die Wärmekapazitätsänderung für den Übergang bei T° , $[L]_{T_m}$ die Konzentration der ungebundenen Ligandes bei T_m und n die Zahl der Bindungsstellen für den Liganden auf dem Protein.

Für die Berechnung der freien Ligandkonzentration beim Schmelzpunkt T_m werden folgende Gleichungen benötigt:

$$[L]_{T_m} = L_{tot} - \frac{nP_{tot}}{2}, \text{ wenn: } (L_{tot} > nP_{tot}) \quad (12)$$

$$[L]_{T_m} = \frac{nP_{tot}}{2}, \text{ wenn: } (L_{tot} < nP_{tot}) \quad (13)$$

Dabei sind P_{tot} und L_{tot} die gesamten Konzentrationen des Proteins und des Liganden in der Lösung.

2.3 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

2.3.1 Proteinkristallisation

Die Verfügbarkeit von Proteinkristallen ist die Grundvoraussetzung für eine Röntgenstrukturanalyse.

Ein Kristall ist ein oft anisotroper, homogener Körper, der aus einer dreidimensionalen und

periodisch angeordneten Struktureinheit besteht. Auch organische Materie kann Kristalle formen. Man findet aber organische Moleküle wie z.B. Proteine in der Natur nur selten kristallin. Daher muß man Bedingungen finden, um für die Strukturaufklärung Proteine kristallisieren zu können. Einige Proteine kristallisieren sehr gut; bei anderen wiederum ist es sehr zeitaufwendig, die geeigneten Kristallisationsbedingungen zu finden.

Eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Proteinkristallisation ist eine hohe Reinheit des Proteins. Mögliche Verunreinigungen sind z.B. Fremdproteine, Abbauprodukte, Oligomere, Isoformen oder falsch gefaltete Proteine. Das nächste Problem, das sich unmittelbar anschließt, ist die Überwindung der sogenannten Keimbildungsbarriere. Wie in Abbildung 7 dargestellt, können sich Kristallisationskeime nur in übersättigten Lösungen bilden. In der Keimbildungszone entstehen bevorzugt viele kleine Kristalle. Dieser Bereich ist daher für das Wachstum einzelner Kristalle sehr ungünstig. Für die Züchtung einzelner „großer“ Kristalle sollte die Lösung daher im metastabilen Bereich gehalten werden. In dieser Zone können sich keine neuen Nukleationskeime ausbilden, aber bereits geformte Kristalle weiterwachsen. In der Präzipitationszone fallen Proteine ohne Nukleation aus.

Die Kristallisation von Proteinen ist ein vieldimensionales Problem mit variierbaren Parametern. Es sind unterschiedliche Techniken zur Kristallisation von Proteinen bekannt, wobei im allgemeinen der Dampfdiffusions-Methode die größte Bedeutung zukommt. Bei dieser häufig und mit großem Erfolg angewandten Methode wird die Proteinlösung mit einem Fällungsmittel versetzt und anschließend mit einer höherkonzentrierten Lösung desselben Fällungsmittels äquilibriert (Übersichtsartikel: McPherson, 1982). Durch Diffusion der flüchtigen Komponenten (insbesondere des Wassers) über die Gasphase kommt es zu einer langsamen Zunahme der Fällungsmittelkonzentration in der Proteinlösung bis der Bereich der Übersättigung erreicht ist, in dem es zur spontanen Kristallkeimbildung kommen kann. Sind bestimmte Fällungsmittel- und Proteinkonzentrationen erreicht, führen diese zu intermolekularen Protein-Protein-Wechselwirkungen, die im idealen Fall die Anordnung zum Proteinkristall bewirken (Abbildung 7). In der ersten Phase, der *Keimbildung*, bilden sich erste geordnete Proteinaggregate, an die sich in der Phase des *Wachstums* weitere Moleküle anlagern können. Um eine geeignete Umgebung für die Kristallisation zu schaffen, werden Fällungsmittel mit verschiedenen Arten von Additiven kombiniert sowie der pH-Wert und die Temperatur variiert:

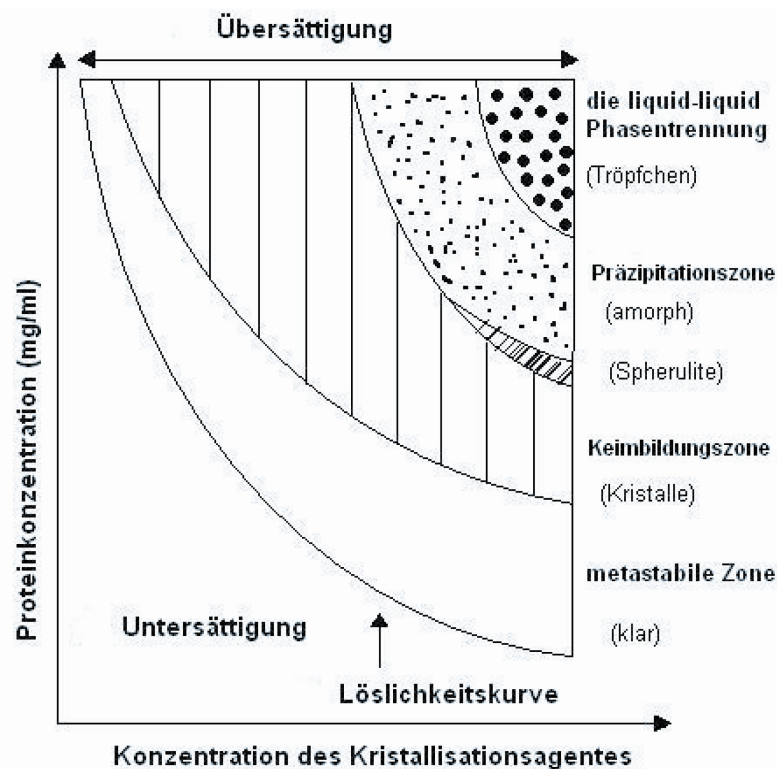


Abbildung 7: Schematisches Phasendiagramm der Proteinkristallisation. Dargestellt sind die verschiedenen Zonen und die unterschiedlichen Typen der festen Phase.

- *Fällungsmittel* verringern die Löslichkeit eines Proteins. Allgemein werden als Fällungsmittel Salze, Polyethylenglykole oder organische Lösungsmittel verwendet.
- Der *pH-Wert* der Lösung wird durch einen geeigneten Puffer eingestellt. Die Löslichkeit aller Proteine hängt vom pH-Wert ab. An seinem *isoelektrischen Punkt* besitzt ein Protein seine niedrigste Oberflächen-Nettoladung und damit auch seine geringste Löslichkeit.
- Die *Temperatur* beeinflusst die Kristallisation auf entscheidende Weise, da sie den Dampfdruck im geschlossenen System und damit den Konzentrationsausgleich bestimmt.
- *Detergenzien* erhöhen die Löslichkeit eines Proteins, können aber auch aufgrund von Wechselwirkungen mit besonders hydrophoben Proteinbereichen ein geordnetes Kristallwachstum bewirken.
- *Weitere Additive* decken zusätzliche Parameter ab: Durch Salzzugabe wird die Ionenstärke der Lösung erhöht. Dadurch kann die Löslichkeit eines Proteins entweder erhöht oder verringert werden. Vernetzende Reagenzien (*crosslinker*) können unter bestimmten Bedingungen das Kristallwachstum positiv beeinflussen.

Für jedes Protein müssen die Kristallisationsbedingungen individuell ausgearbeitet werden. Meistens wird zu Beginn ein statistischer Ansatz mit faktoriellen Kristallisationsbedingungen nach dem Prinzip des *sparse matrix screens* (Carter und Carter, 1979; Jancarik und Kim, 1991) ausgewählt.

Bei der Kristallbildung durch Dampfdiffusion gibt es zwei prinzipielle Methoden: die *hanging drop*-Methode und die *sitting drop*-Methode (Abbildung 8). Dabei kann der Tropfen der proteinhaltigen Lösung entweder in einer Vertiefung über der Reservoirolösung sitzen („*sitting*

drop“) oder hängend über dem Reservoir platziert werden („*hanging drop*“). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Kristallisation nach der Dampfdiffusionsmethode mit sitzendem Tropfen.

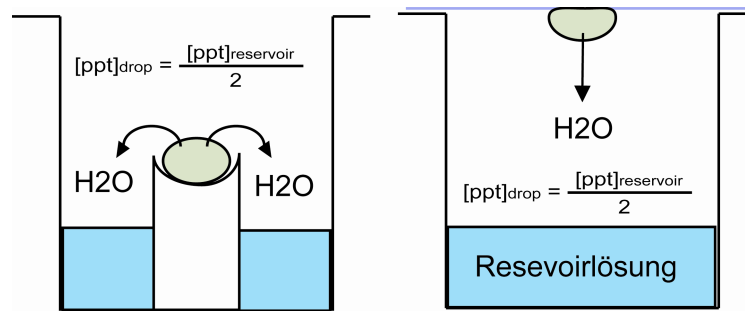


Abbildung 8: „Sitting“- und „Hanging drop“-Methode der Dampfdiffusion.

2.3.2 Strukturlösung durch molekularen Ersatz

2.3.2.1 Berechnung der Elektronendichte

Bei der Röntgenstrukturanalyse wird ein Röntgenstrahl an den Elektronenhüllen der Atome in der Probe gebeugt. Daher ergeben sich aus dem Röntgenbeugungsexperiment nicht sofort die genauen Atompositionen, sondern die dreidimensionale Verteilung der Elektronen der Atome, die als Elektronendichteverteilung bezeichnet wird. Für jeden Beugungsreflex (h , k , l) lässt sich dabei ein komplexer Strukturfaktor $F(h, k, l)$ bestimmen. Das Quadrat des Betrages des Strukturfaktors in einer Einheitszelle ist proportional zur Intensität $I(h, k, l)$ eines Reflexes im Beugungsbild:

$$I(h, k, l) \propto |F(h, k, l)|^2 \quad (14)$$

Der Strukturfaktor $F(h, k, l)$ ist durch das Fourierintegral der Elektronendichtefunktion über das Volumen V der Elementarzelle gegeben:

$$F(h, k, l) = \int_{V_z} \rho(\vec{r}) e^{i\vec{G}\vec{r}} dV \quad (15)$$

\vec{G} ist der dem Reflex h, k, l zugeordnete Gittervektor. Bei Kenntnis aller Strukturfaktoren $|F(h, k, l)|$ ergibt sich die Elektronendichteverteilung durch folgende Fourierreihe:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(h, k, l)| e^{-2\pi i(hx+ky+lz) + i\alpha_{hkl}} \quad (16)$$

Elektronendichte Strukturalplituden Basisfunktion Phase

Für die Berechnung der Elektronendichte sind sowohl die Strukturfaktoramplituden $F(h, k, l)$ als auch die Phasen $\alpha(h, k, l)$ notwendig. Bei einem Röntgenbeugungsexperiment können allerdings aus den gemessenen Intensitäten der einzelnen Beugungsreflexe nur die Amplituden der einzelnen Strukturfaktoren bestimmt werden. Die Aufnahmen lassen keinerlei Aussage über die Phasen zu. Diese Unbestimmtheit wird in der Proteinkristallographie als

Phasenproblem bezeichnet.

2.3.2.2 Lösung des Phasenproblems

Das Phasenproblem kann durch sogenannte direkte Methoden oder durch Pattersonmethoden gelöst werden.

Während in der Kleinmolekülkristallographie das Phasenproblem durch physikalische Einschränkungen (Elektronendichte muss positiv sein, diskrete Atome etc.) gelöst werden kann, ist dies in der makromolekularen Kristallographie aufgrund der Größe und insbesondere aufgrund der sehr limitierten Auflösung der Röntgendaten in den allermeisten Fällen nicht möglich. Stattdessen werden hauptsächlich drei Methoden angewendet:

- 1) isomorpher Ersatz (SIR/MIR)
- 2) multiple anomale Streuung (MAD)
- 3) molekularer Ersatz (MR)

Die ersten beiden Methoden werden bei der *de novo* Strukturbestimmung verwendet, die letzte bei der Analyse homologer Strukturen. Der *multiple isomorphe Ersatz* („*multiple isomorphous replacement*“, „MIR“) und der *einfache isomorphe Ersatz* („*single isomorphous replacement*“, „SIR“) sind die ältesten Methoden zur Lösung neuer Proteinstrukturen. Man stellt Schwermetallderivate des Proteinkristalls her, die man zur Messung von Röntgenbeugungsdaten verwendet.

Durch die hohe Elektronendichte der Schwermetallderivate kann die Lage der Schwermetallatome im Kristall berechnet werden (*Patterson-Methode*). Hieraus können wiederum die Strukturfaktoramplituden und –phasen der Schwermetallatome bestimmt werden, was schließlich zur Phasierung der Gesamtstruktur ausgenutzt werden kann. Voraussetzung für die Lokalisierung der Schwermetallatome und die spätere Phasenberechnung ist die Isomorphie zwischen dem nativen Kristall und dem Derivatkristall, d.h. das Hinzufügen der Schwermetallatome darf die Proteinstruktur nicht verändern.

Eine weitere Methode ist die sogenannte *multiple anomale Dispersion* (MAD). Die Elektronen, an denen die Streuung erfolgt, werden normalerweise in guter Näherung als freie Elektronen beschrieben. Dies gilt jedoch nicht mehr in der Nähe der Absorptionskante des Schwermetallatoms. In diesem Fall interagieren die inneren Elektronen mit dem Atomkern und können Röntgenlicht absorbieren. Die Phasen der Röntgenreflexe hängen nun nicht mehr allein von den Atomabständen, sondern auch von Absorptionsprozessen ab. Bei der MAD wird das Beugungsbild eines Kristalls, welcher einen (oder mehrere) anomale Streuer enthält, bei verschiedenen Wellenlängen der Röntgenstrahlung aufgenommen. Die Wellenlängen werden so gewählt, daß sie um die Absorptionskante herum liegen: Eine auf dem Peak der Absorptionskante, eine am Wendepunkt und eine auf der höherenergetischen Seite der Kante, und eventuell noch eine vierte Wellenlänge auf der niederenergetischen Seite der Kante. Aus diesen Messungen können dann die benötigten Phaseninformationen

berechnet werden. Entscheidender Vorteil der MAD ist, daß alle Messungen am gleichen derivatisierten Kristall durchgeführt werden können und somit keine Fehler durch Nichtanisotropie auftreten.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Lösung der Proteinstrukturen die Methode des Molekularen Ersatzes verwendet. Beim Molekularen Ersatz werden die ersten Phaseninformationen aus einem strukturell ähnlichen Protein gewonnen (Suchmodell z.B. homologe Proteine, Mutanten, Protein-Inhibitor-Komplexe). Je höher die Ähnlichkeit zwischen dem verwendeten Modell und dem unbekannten Protein, desto leichter ist es, die Struktur durch molekularen Ersatz zu finden. Als Faustregel gilt, daß die Sequenzidentität der beiden Proteine mindestens 30% betragen, und das verwendete Modell einen möglichst vollständigen Datensatz besitzen sollte.

Die Voraussetzungen für die Verwendung des molekularen Ersatzes sind:

- das gemessene Diffraktionsmuster der unbekannten Struktur und
- die atomaren Koordinaten des Suchmodells.

Ziel des Molekularen Ersatzes ist es, das Suchmodell so innerhalb der Elementarzelle der unbekannten Proteinstruktur zu orientieren und zu positionieren, daß ihre Positionen übereinstimmen. Wenn sich in der asymmetrischen Einheitszelle der unbekannten Struktur nur ein Proteinmolekül befindet, wird die Position des Suchmodells durch sechs Parameter (drei für die Translation und drei für die Rotation) vollständig beschrieben. Die sechsdimensionale Suche kann durch die Entkoppelung der Rotation und Translation in zwei dreidimensionalen Suchen reduziert werden. In Abbildung 9 ist das Prinzip des molekularen Ersatzes dargestellt.

Der Molekulare Ersatz basiert auf den Eigenschaften der Pattersonfunktion, die nur von den Strukturfaktoramplituden und nicht von den Phasen abhängig ist. Die Pattersonfunktion ergibt sich als Fouriertransformierte der Intensitätsfunktion. Es gilt:

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |\overline{F}(h, k, l)|^2 \cos(2\pi [hu + kv + lw]) \quad (17)$$

Dabei bezeichnet V das Volumen der Einheitszelle und $|F(h, k, l)|$ die Strukturfaktoramplituden mit dem Index h, k, l . Bei der Rotationsuche wird zunächst die Orientierung des Suchmodells in der asymmetrischen Einheit der Elementarzelle der unbekannten Struktur bestimmt.

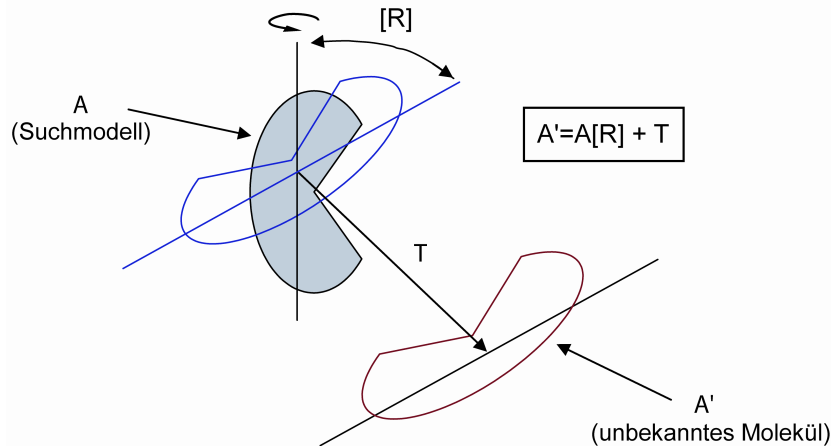


Abbildung 9: Das Prinzip der Methode des molekularen Ersatzes. Durch Rotation und Translation innerhalb der asymmetrischen Einheitszelle der unbekannten Proteinstruktur wird die Position des Suchmodells angepaßt. Molekül A stellt das Suchmodell dar und Molekül A' die unbekannte Struktur. [R] repräsentiert die Rotationsmatrix und T die Translationsvektoren.

Die Pattersonfunktion des Suchmodells wird dabei gegen die Pattersonfunktion der unbekannten Struktur gedreht. Die Rotation nutzt die Tatsache aus, daß die intramolekularen Vektoren (Selbstvektoren) nur von der Orientierung der Moleküle und nicht von ihrer Positionierung in der Elementarzelle abhängig sind. Die entsprechenden Positionen in der beobachteten und der berechneten Pattersonkarte werden miteinander multipliziert, um den Grad der Überlagerung der beiden Pattersonfunktionen zu quantifizieren. Die Maxima der entsprechenden Rotationsfunktion sind die besten Orientierungen der beiden Vektorsätze zueinander und werden später als Euler- oder Polarwinkel für die Translationssuche verwendet. Die Rotationsfunktion läßt sich mathematisch folgendermaßen darstellen:

$$R(C) = \int_V P_1(u) * P_2(C, u) dU \quad (18)$$

Dabei ist $P_1(u)$ die Pattersonfunktion des Kristalls der unbekannten Struktur und $P_2(C, u)$ die mit der Rotationsmatrix C gedrehte Pattersonfunktion des Suchmodells. V ist das durch die Länge des Selbstvektors gegebene Volumen der Pattersonfunktion.

Nachdem die Orientierung des Suchmodells gefunden ist, wird die Positionierung des richtig orientierten Modells meist mit der Hilfe der intermolekularen Pattersonvektoren durchgeführt (Translationslösung). Diese Vektoren sind von der Position der Moleküle in der Elementarzelle abhängig. Das Suchmodell wird entlang kristallographischer Symmetrieachsen so bewegt, daß sich eine maximale Überlappung mit den gemessenen Diffraktionsdaten der unbekannten Struktur ergibt. Es gilt:

$$T(\tau) = \int_V P_1(u) * P_2(\tau, u) du \quad (19)$$

Dabei ist $P_1(u)$ die Pattersonfunktion des Kristalls der unbekannten Struktur und $P_2(\tau, u)$ die mit der Translationsmatrix τ gedrehte Pattersonfunktion des Suchmodells. V ist das durch die Länge des Translationsvektors gegebene Volumen der Pattersonfunktion.

2.3.3 Verfeinerung der Struktur mit „restraints“ und „constraints“

Unabhängig von der verwendeten Methode liegt nach der Strukturlösung meist ein unvollständiges und fehlerhaftes Modell der Struktur vor. Das Ziel einer Strukturverfeinerung ist es, das Atommodell bestmöglich mit den Messdaten in Einklang zu bringen. Es wird dabei versucht, die Differenz zwischen den aus dem atomaren Modell berechneten Strukturfaktoramplituden $|F_{calc}|$ und den experimentell bestimmten Strukturfaktoramplituden $|F_{obs}|$ zu minimieren. Dabei werden sowohl die Positionen der einzelnen Atome als auch die Temperaturfaktoren (B-Faktoren) optimiert. Als Ziel bei allen Verfeinerungsschritten wird der kristallographische R-Wert minimiert:

$$R = \frac{\sum_{hkl} ||F_{obs, hkl}| - k |F_{calc, hkl}||}{\sum_{hkl} |F_{obs, hkl}|} \quad (20)$$

Hierbei ist k ein Skalierungsfaktor zwischen Modell- und experimentellen Strukturfaktoramplituden. Um die Überfeinerung des Modells zu vermeiden, verfeinert man zuerst die Koordinaten der Atome, während man die Temperaturfaktoren konstant auf einem einheitlichen Wert hält. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten die umsetzen. Durch flexible stereochemische Zwänge („*restraints*“) wird die Anzahl der für die Berechnung verwendeten Reflexe erhöht und durch strikte stereochemische Zwänge („*constraints*“) kann die Zahl der variablen Parameter reduziert werden. Typische „*restraints*“ umfassen die Bindungslänge, den Bindungswinkel oder die van-der-Waals-Abstände. Zusätzlich halten „*restraints*“ die planaren Gruppen planar und erhalten die Chiralität der chiralen Zentren. „*Constraints*“ verhindern die Verschiebungen mehrerer Atome zueinander. Beispielsweise können Teile eines Moleküls zu starren Körpern („*rigid body*“) zusammengefaßt werden, deren Atomkoordinaten nur synchron verändert werden können. Die Definition der strikten Zwänge ist nur am Anfang der Verfeinerung nützlich und gerechtfertigt, denn in der Endphase sind individuelle Anpassungen sämtlicher Freiheitsgrade nötig.

Während der Verfeinerung soll die gesamte Energie der Struktur einem globalen Minimum zustreben. Es kann aber passieren, daß sich die Struktur nur einem lokalen Energieminimum annähert. Um das zu vermeiden wird häufig ein sogenanntes „*simulated annealing*“ durchgeführt, bei dem das Proteinmolekül virtuell auf 5000K aufgeheizt und dann langsam

abgekühlt wird. Hierbei wandern die Atome aus lokalen Minima in eine optimierte Gleichgewichtsposition (Abbildung 10).

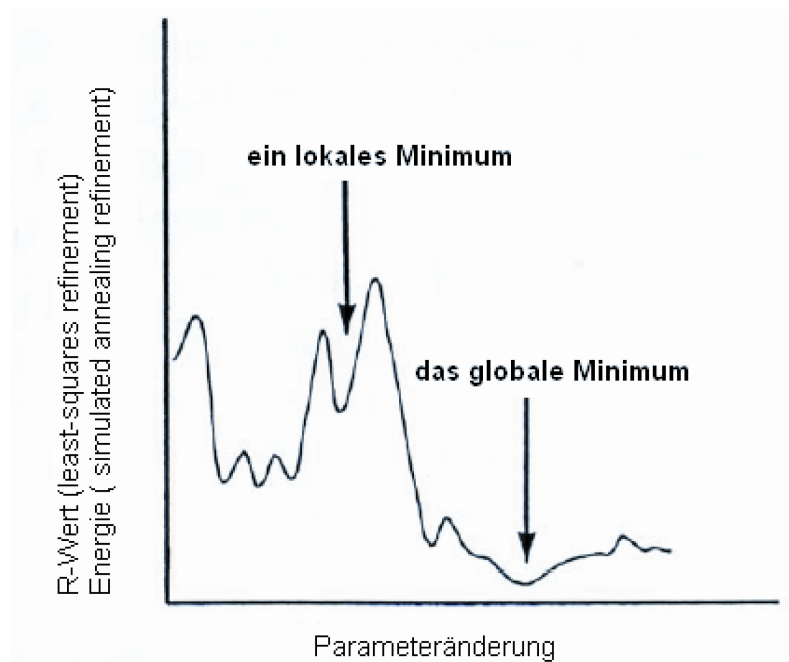


Abbildung 10: Das Konzept der Energieminimierung. Dargestellt ist die Änderung des R-Werts (least-squares refinement) bzw. der Energie (simulated annealing refinement) in Abhängigkeit einzelner Verfeinerungsparameter.

Während der Verfeinerung wird der Reflexdatensatz in einen Testdatensatz und einen Arbeitsdatensatz unterteilt. Für den Testdatensatz werden nur 5 bis 10% der beobachteten Reflexe zufällig aus dem gesamten Datensatz ausgewählt. Der Testdatensatz wird für die Berechnung des sogenannten R_{free} -Wertes verwendet. Der R_{free} -Wert gilt als Maß für die Verbesserung der Qualität des bearbeiteten Strukturmodells. Wenn der R_{free} -Wert sinkt, wurde das Modell tatsächlich verbessert. Der R_{work} -Wert charakterisiert den Arbeitsdatensatz.

Eine weitere Möglichkeit zur Bewertung der Qualität der Struktur stellt das Programm *Procheck* dar. Hierbei werden die Strukturen nach folgenden Kriterien untersucht: Sind die Drehwinkel der Haupt- und Seitenketten typisch für bekannte Werte von hochaufgelösten Strukturen? Stimmen die Bindungslängen, die Bindungswinkel und die van-der-Waals-Abstände mit denen bekannter Proteinstrukturen überein?

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien, Geräte und EDV-Systeme

Die wichtigsten Geräte, Materialien und EDV-Systeme sind in Tabelle 3, Tabelle 4 und Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 3: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
FPLC-System	Amersham Pharmacia, Freiburg
Säule:	
CM Sepharose	Whatman, Kent, England
P11 Cellulose	Whatman, Kent, England
Hi Trap Q	Amersham Pharmacia, Freiburg
HiTrap Heparin	Amersham Pharmacia, Freiburg
Resource S	Amersham Pharmacia, Freiburg
HiPrep Superdex 200	Amersham Pharmacia, Freiburg
Kalorimetrie:	
Differential Scanning Calorimeter	MicroCal, Northhampton MA, USA
Isothermal Titration Calorimeter	MicroCal, Northhampton MA, USA
MALDI-MS Biflex III (TOF)	Bruker, Bremen
French Press Amico mit FA-030	SLM-Instruments, Rochester, USA
Flächenzähler:	
MAR 345	MAR Research, Hamburg
DIP-2030	MAC Science, Yokohama, Japan
Monochromatoren:	
MAC-XOC Doppelspiegel	MAR Science, Yokohama, Japan
CMF 12-38Cu6 Doublemirror	Osmic, Northwood, USA
Mikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Spiegelreflexkamera EOS 500N	Canon, Tokyo, Japan

Tabelle 4: Sonstige Materialien.

Gerät	Hersteller
Goniometerköpfe	Stoe, Darmstadt, Hampton Research, USA
Cryoloops	Hampton Research Laguna Niguel CA, USA
sonstige Cryowerkzeuge	Hampton Research Laguna Niguel CA, USA
Kristallisationsschalen	Hampton Research Laguna Niguel CA, USA
Kristallisation screens	Hampton Research Laguna Niguel CA, USA
Waagen:	
Analysewaage FA-210-4	Faust, Köln
Laborwaage SBA 52	Scaltec, Heiligenstadt
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Reinstwasseranlage	Seralpur
Spektralphotometer Ultrspec 2000	Amerhsam Pharmacia, Freiburg
Bradford-Kit	Bio-Rad, München
Zentrifugen:	
RC 3B Plus und RC 5B Plus	Sorvall, Newtown CT, USA
5417 C und 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Aufkonzentrierung:	
Centricon-30	Millipore, Eschborn

Tabelle 5: Computerprogramme und EDV-Systeme

Programm/Programmpaket	Referenz
Kristallographie:	
CCP4/CCP4i –suite	CCP4 (1994)
HKL-suite	Otwinowski & Minor (1997)
Graphikprogramme:	
O	Jones <i>et al.</i> (1991)
BRAGI	Schomburg & Reichelt
	DeLano Scientific LLC, San Carlos CA, USA
PyMOL	
Analyse von Röntgenstrukturen:	
CCP4/CCP4i –suite	CCP4 (1994)

3.2 Molekularbiologische Arbeiten

3.2.1 LB-Medium

Autoklaviertes LB (Luria-Bertani)-Flüssigmedium wurde zur Expression rekombinanter Proteine und zur Vermehrung von Plasmid-DNA mit 75µg/ml Ampicillin versetzt. Für dieses Medium wurden 10g Pepton, 5g Hefeextrakt und 10 g NaCl in 950ml Reinstwasser unter Rühren gelöst. Das Medium wurde mit 5N NaOH auf pH=7.0 eingestellt und auf 1L aufgefüllt.

3.2.2 Agarplatten

Es wurden 400ml LB-Medium mit 7.0g Agar gemischt. Die fertige Mischung wurde autoklaviert und bei 50°C temperiert. In das temperierte Medium wurde das Antibiotikum Ampicillin in gewünschter Endkonzentration (75µg/ml) zugegeben. Sterile Petrischalen wurden damit unter dem Sterilbank befüllt.

3.2.3 Kompetente Zellen

Es wurden kompetente Zellen des Stamms LB21(DE3) sowie XLIBLue -Zellen hergestellt. Dazu wurde mit einer Impföse *E.coli*-Zellen aus einer Glycerinkultur geschabt und auf einer Agarplatte aussgestrichen. Die LB21(DE3) -Zellen weisen Ampicillin-Resistenz auf, die XLIBLue-Zellen besitzen keine Antibiotika-Resistenz. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Von der Agarplatte wurde eine einzelne Zellkolonie gepickt und in 25ml LB-Medium überführt. Die Kultur (Start-Kultur) wurde bei 37°C für 6 – 8 Stunden geschüttelt (250 – 300rpm). 250 ml LB-Medium wurden mit 2.0 ml der Start-Kultur angeimpft. Das LB-Medium wurde über Nacht bei 20°C unter langsamen Schütteln (200 rpm) inkubiert (Übernacht-Kultur). Nachdem die Zelldichte des Mediums bei 600 nm OD = 0.6 – 0.8 erreicht hatte, wurde der Ansatz auf zwei 50ml Falconröhrchen verteilt und 10min bei 4°C und 2500g (Sorvall-Zentrifuge RC 5B) zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstands wurde das Pellet im 12ml eiskaltem 0.1M CaCl₂ resuspendiert und anschließend bei 4°C und 2500g für 10min zentrifugiert. Der Verlauf wurde noch einmal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen wieder in 20ml 0.1M CaCl₂ resuspendiert, und zur Suspension wurde 1,5ml DMSO-Lösung zugegeben. Nun wurden die Zellen 10min auf Eis inkubiert. Die Zell-Suspension wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bei -70°C gelagert.

3.2.4 Transformation

100µl transformationskompetente Zellen (BL21(DE3)) wurden auf Eis aufgetaut, mit 100ng der Plasmid-DNA-Lösung versetzt und weitere 20min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 90sec exakt bei 42°C hitzeschockbehandelt und anschließend 2min auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 900µl LB-Medium wurde der Transformationsansatz für 1 Stunde bei 37°C kultiviert. 150µl der Ansätze wurden auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (75 µg/ml) ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.2.5 Expression

3.2.5.1 Expression der Proteine *hsCK2αΔC* und *hsCK2β*

Es wurden einzelne Kolonien aus den mit transformierten Zellen bewachsenen Platten gepickt, und diese über Nacht in 50 ml LB-Medium (mit Ampicillin) bei 37°C und 220rpm angezogen. (Übernachtskultur). 5ml von diesen Übernachtskulturen wurden jeweils in 0.5L LB-Medium überführt und bei 37° und 220rpm bis zu einer OD_{600nm} von 0.6 – 0.8 inkubiert. Die Induktion der Expression des rekombinanten Proteins erfolgte durch Zugabe von 0,5ml IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1mM und weiterem Schütteln bei 30°C für 2-3 Stunden. Anschließend wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde weiter bearbeitet, indem es in eiskalter 0.9g/l NaCl /200mM PMSF – Lösung resuspendiert und die entstehende Zellsuspension bei 4000rpm für 15min zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Die letzte Zentrifugation erfolgte bei 12000rpm und 4°C für 20min in SS34-Röhrchen. Das Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70° aufbewahrt.

3.2.5.1 Expression des Proteins *spCK2α*

Der Ablauf der Expression war analog zu *hsCK2α* und *hsCK2β* und unterschied sich nur in der Behandlung des Pellets nach der ersten Zentrifugation. Der Pellet wurde in eiskalter 0.9% NaCl - Lösung resuspendiert. Nach der Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm wurde der Schritt der Resuspendierung des Pellets in NaCl - Lösung zweimal wiederholt. Die letzte Resuspendierung des Pellets erfolgte in 0.1% TritonX100 - Lösung, im Anschluß wurde Zellsuspension aliquotiert und bei -70° eingefroren.

3.3 Proteinreinigung

Es wurden unterschiedliche Reinigungsprotokolle für das *hsCK2*-Holoenzym, *hsCK2α*, *hCK2β* sowie *spCK2α* verwendet (Abbildung 11):

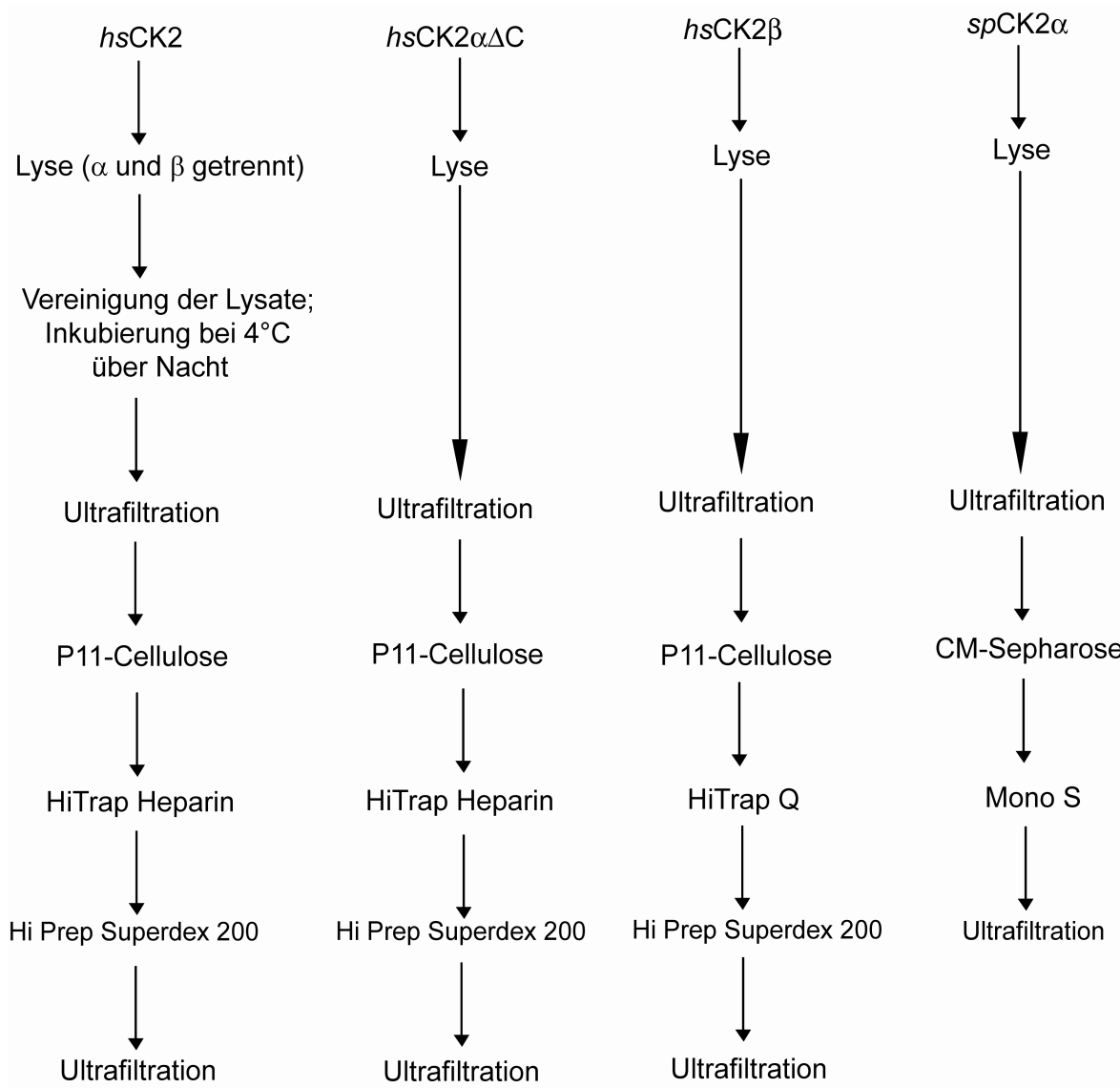


Abbildung 11 : Schematische Vorstellung der unterschiedlichen Reinigungsprotokolle

3.3.1 Zellaufschluss und Zentrifugation

Vor dem Zellaufschluß wurden die Zellen unterschiedlich behandelt.

3.3.1.1 *hsCK2 α* Δ C

Die Zellen wurden mit 1.5ml Aufschlußpuffer 25mM Tris/HCl, 0.3M NaCl (pH=8.0) pro Gramm Zellen resuspendiert und in der „French Press Cell“ bei einem Druck von 500 psi aufgeschlossen. Es wurde pro Aufschluß bis zu 15g Zellen verwendet. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in einem SS34-Rotor bei 4°C und 15000rpm für 30min zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Das Pellet nach der Zentrifugation wurde verworfen, der Überstand für die weitere Aufreinigung verwendet.

3.3.1.2 *hsCK2*

Für die Herstellung des Komplexes *hsCK2* wurden die Zellen, die *hsCK2 α* Δ C und *hsCK2 β* enthalten, in der „French Press Cell“ getrennt aufgeschlossen. Die Lysate wurden vereinigt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

3.3.1.3 *spCK2 α*

Nach dem Auftauen der Zellsuspension in der 0.1% Triton X-100-Lösung wurde je 15 ml Suspension folgendes zugefügt: 100 μ l Lysozym (5mg/ml), 25 μ l DTT (1mM), 60 μ l PMSF (1M), 80 μ l MgCl₂ (1M) und 25 μ l Leupeptin (0.5 μ g/ml). Dann wurden die Zellen gemäß 3.3.1.1 bearbeitet.

3.3.2 Chromatographische Methoden

3.3.2.1 Kationenaustausch-Chromatographie

Für die Reinigung von *hsCK2 α* Δ C, *hsCK2 β* und *hsCK2* wurde eine Phospho-Cellulose-Säule als erster Reinigungsschritt verwendet. Die P11-Cellulose ist ein bifunktionaler Kationenaustauscher, der schwach und stark saure Gruppen enthält. Ein solches Medium wird gewöhnlich für die Trennung von Enzymen verwendet, die ATP-abhängige Wechselwirkungen der Phosphat-Gruppen katalysieren. Deshalb handelt es sich eigentlich um eine Affinitätschromatographie. Bei pH=8.5 liegen die Enzyme nicht kationisch vor. Für den Lauf wurden zwei Puffer verwendet: Puffer A – 25mM Tris/HCl pH=8.5, 0.3M NaCl, 1mM

DTT und Puffer B – 25mM Tris/HCl pH=8.5, 1.2M NaCl, 1mM DTT. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde mit 0.5ml/min auf die Säule aufgetragen und bei der gleichen Flußrate in einem linearen Gradienten mit steigender Salzkonzentration eluiert: 0.3M – 1.2M NaCl innerhalb 250ml. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt.

Die CM-Sepharose-Säule ist eine schwache Kationenaustausch-Säule, die als erster Reinigungsschritt bei der *spCK2α* verwendet wurde. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde auf die Säule bei einer Flußrate von 2 ml/min aufgetragen. Das Protein eluierte bei einer Salzkonzentration von ca. 0.8M NaCl.

3.3.2.2 Kationenaustausch-Chromatographie

Die Resource S-Säule wurde als zweiter Reinigungsschritt des Proteins *spCK2α* verwendet. Die vereinigten Fraktionen nach der CM-Sepharose wurden vor dem Auftragen auf die Resource S-Säule mit dem Puffer aus 50mM Tris/HCl, 0.1mM EDTA, 0.1mM PMSF, 10%Glycerol (pH=7.0) bis zu einer Salzkonzentration von 0.1M NaCl verdünnt. Das reine Protein eluierte bei 0.3M NaCl in einem Konzentrationsgradienten 0.0M – 1.2M NaCl und konnte schon nach dem zweiten Reinigungsschritt für die Kristallisation verwendet werden.

3.3.2.3 Affinitäts-Chromatographie

Als zweiter Aufreinigungsschritt für die *hsCK2αΔC*, *hsCK2*-Holoenzym und *hsCK2β* wurde die Affinitätssäule – HiTrap Heparin HP benutzt. Die aktiven Fraktionen aus dem vorherigen Schritt wurden mit dem Puffer C (Puffer A ohne NaCl) im Verhältnis Proteinlösung: Puffer C = 2 : 3 verdünnt, und nach Auftragen auf die Säule bei einer Flußrate von 5 ml/min auf die Säule aufgetrennt. Die Elution fand in einem linearen Gradienten von 0.4M – 1.0M NaCl innerhalb von 150ml statt. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt.

3.3.2.4 Gelpermeations-Chromatographie

125 ml HiPrep Superdex 200 HP wurde als dritter und abschließender Reinigungsschritt für die Proteine *hsCK2αΔC* und das *hsCK2*-Holoenzym angewendet. Die Flußrate war 0.5 ml/min. Die Säule wurde mit folgender Lösung: 25mM Tris/HCl, 0.5M NaCl, 1mM DTT äquilibriert.

3.3.3 Konzentrierung durch Ultrazentrifugation

Es wurden Ultrafiltrationsröhrchen der Firma Amicon mit einer Ausschlussgrenze von 30000Da (Centricon 30) verwendet. Die Ultrafiltration erfolgte durch Zentrifugation der

Röhrchen bei 4° und 3000xg für von ca. 1 Stunde.

3.4 Proteinanalytische Methoden

3.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde ausschließlich das System POWER N PAC 300 (Firma: BioRad) verwendet.

Für die SDS-PAGE wurden vorgefertigte Gradientengele verwendet, die aus einer Sammelzone mit geringer Acrylamidkonzentration und einer Trenngelzone (8-25% Acrylamid) bestehen. Das Proteinprobe wurde mit dem Verdünnungspuffer (25mM Tris/HCl (pH=8.5), 0.5M NaCl) auf eine Konzentration von etwa 59µM gebracht. 15µl des verdünnten Proteins wurden mit 5µl Auftragspuffer, der Natriumdodecylsulphat und β-Merkaptoethanol enthielt, gemischt, 10min bei 95°C inkubiert und anschließend scharf zentrifugiert. 18µl der Probe wurden auf das Gel aufgetragen.

Nach abgeschlossener elektrophoretischer Trennung wurden die Gele mit der Lösung Rotiphoese Blau R (Firma: Roth) gefärbt. Durch das Waschen mit einer Lösung (8% CH₃COOH/25% Ethanol) wurden die Proteine sichtbar gemacht. Als Proteinmarker wurde der Standard Roti-Mark 10 -150 (Firma: Roth) verwendet.

3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des „*Standard Assays*“ von BioRad nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Der Assay enthält das Reagenz Coomassie Brilliant Blue, das mit dem Protein einen gefärbten Komplex bildet, welcher bei 595 nm absorbiert.

Die Komplexbildung verläuft linear mit zunehmender Proteinkonzentration. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin. Es wurden 200 µl BioRad- Reagenz mit 798 µl H₂O und 2 µl Proteinlösung gemischt und nach 5 min Inkubation bei RT die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert, bestehend aus 200 µl BioRad-Reagenz und 800µl H₂O, spektralphotometrisch gemessen.

3.4.4 Massenspektrometrie

Für die Charakterisierung von Reinheit, Größe und Zusammensetzung des Proteins wurde ein massenspektrometrisches Verfahren angewendet: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)* (Karas, 1988).

Für die MALDI-Analyse wird die Proteinprobe auf einem metallischen Probenträger (Target) mit einem großen Überschuß an niedermolekularer Matrix co-kristallisiert. Unter Hochvakuum wird die Probe anschließend mit Laserlicht bestrahlt und dadurch mit der Matrixsubstanz in die Gasphase gerissen. Im elektrischen Feld wird dann die ionisierte Probe abhängig von Masse und Ladung beschleunigt und schließlich in einem Flugzeitanalysator detektiert.

Je nach Masse/Ladungsverhältniss erreichen die Ionen den Flugzeitanalysator mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten und durchqueren die Flugstrecke des Analysators dabei unterschiedlich schnell. Die Analysatoren können die Ionen dabei nur nach dem m/z -Verhältnis trennen. Es wurde über den externen Standard Trypsinogen (23981Da) kalibriert. Zur Preparation wurden 5µl einer 5mg/ml Proteinprobe mit 25µl 0.1% Trifluoressig-säure (TFA) sowie mit 30 µl Sinapinsäurelösung (gesättigt in Acetonitril/H₂O 1:2, 0.1%TFA) versetzt. Auf dem Target wurden die Spots zunächst mit 0.5 µl gesättigter Sinapinsäurelösung benetzt und antrocknen gelassen. Anschließend wurden 0.5µl Probe/Matrix auf den Spot pipetiert und ebenfalls trocknen gelassen.

3.5 Kalorimetrische Messungen

3.5.1 Differentialrasterkalorimetrie (DSC)

Die kalorimetrischen Messungen (*“differential scanning calorimetry“*) zur Bestimmung des Schmelzpunktes des Proteins und zur Abschätzung der Bindungskonstante zwischen den *hsCK2αΔC*- und *hsCK2β*-Untereinheiten wurden mit dem Gerät VP-DSC-Microcalorimeter (Firma: MicroCal) durchgeführt. Die Proteinkonzentration der Proben lag im Bereich zwischen 0.5mg/ml – 1.0mg/ml in 25mM Tris/HCl (pH=8.0), 0.3 M NaCl (oder 1M NaCl). Es wurde gegen den entsprechenden Puffer bei einer Heizrate von 25°C/h gemessen. Probe und Referenz wurden vor der Messung unter Vakuum vollständig entgast. Die Schmelzpunkttemperatur wurde über das Kurvenanpassungsmodell *„non-2-state“* des Auswertungsprogramms (DSC Data Analysis in Origin 7.0.; MicroCal Incorporated) bestimmt. Die Berechnungen der Bindungskonstante wurden nach dem Modell *“Binding Stoichiometry 1:1: Single Unfolding Transition“*, wenn $T_{\text{Komplex}} \leq T_{\text{Ligand}}$ durchgeführt und nach dem Modell *“Binding Stoichiometry 1:1: Two Unfolding Transition“*, wenn $T_{\text{Komplex}} > T_{\text{Ligand}}$ (Brand J.F. & Lin L.-N.; 1990).

3.5.2 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die isothermale Titrationskalorimetrie wurde mit dem Gerät *Omega Isothermal Titration Calorimeter* (Firma: MicroCal) durchgeführt. Sowohl das Protein als auch der Ligand waren in gleicher Pufferlösung mit 25 mM Tris/HCl pH=8.0, 1 M NaCl.suspendiert. Vor den Messungen wurden die beiden Lösungen *hsCK2alphaΔC* (*“protein“*) und *hsCK2beta* (*“ligand“*) gründlich unter Vakuum entgast und 10 Minuten bei 35°C inkubiert. Während des Titrationsexperiments wurden üblicherweise 25 Injektionen der Ligandlösung in die Proteinelösung eingespritzt. Das Volumen einer Injektion war 10µl. Die Proteinkonzentration in der Messzelle war 10µM, die Ligandenkonzentration in der Injektionsspritze entsprach 100µM. Um den Bedingungen in der lebenden Zelle hinsichtlich der Osmolarität näher zu kommen, wurde die Bindungskonstante auch in der Anwesenheit eines Osmolyten, nämlich der Aminosäure Glycin bestimmt. Osmolyte sind Moleküle, die in der Natur dem Schutz der Organismen vor Stress durch einen hohen osmotischen Druck dienen. Die beiden Proteine waren für diese Experimente in 25 mM Tris/HCl (pH=8.0), 1 M NaCl, 1 M Glycin gelöst. Die Datenanalyse wurde mit dem Model „*single set of identical sites*“ durchgeführt.

3.6 Proteinkristallisation

Alle untersuchten Proteine wurden vor der Kristallisation durch Ultrafiltration konzentriert. Die verwendeten Proteinkonzentrationen für die Kristallisationsversuche lagen im Bereich von 3.0 – 7.0 mg/ml. Zur Kristallisation wurde in dieser Arbeit *die Dampfdiffusions-Methode* nach dem „*sitting-drop*“-Verfahren angewandt. Die ersten Kristallisationsversuche wurden mit den kommerziell erhältlichen Screens *I*, *II*, *Cryo*, *(NH₄)₂SO₄-Screens* u.s.w. der Firma *Hampton Research* angesetzt. Die Kristallisation fand in *Cryschem*-Platten statt. Nachdem die Lösungen (Reservoirlösung, Proteinelösung, unterschiedliche Additive oder Detergenzien) zusammenpipettiert worden, wurden die Platten bei unterschiedlichen Temperaturen von 4°C, 12°C und 20°C gelagert. Die Ergebnisse wurden in regelmässigen Abständen unter einem Stereomikroskop untersucht und protokolliert. Die erhaltenen, intialen Kristallisationsbedingungen wurden mit Hilfe weiterer Feinabstimmung durch systematische Variation der pH-und Präzipitanz-Bedingungen und schließlich der Tropfenverhältnisse (Proteinelösung : Präzipitanzlösung) optimiert.

3.7 Röntgendiffraktionsmessungen

Die Kristalle wurden mit den am Institut zur Verfügung stehenden Drehanoden mit Cu-K α -Strahlung und unter Verwendung von Synchrotronstrahlung am EMBL in Hamburg vermessen. Die meisten Datensätze der in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen wurden bei 100 K gemessen: Sowohl die Röntgenquellen am Institut, als auch die Meßplätze am EMBL waren mit Cryostream Cooler 600 Cryoanlagen von Oxford Cryosystems, Oxford, UK, ausgestattet.

3.7.2 Montage des Kristalls

Die Wechselwirkung der Proteinkristalle mit Röntgenstrahlen verursacht Schäden am Kristall, wodurch die Streuqualität des Kristalls mit der Zeit nachlässt.

Aus diesem Grund wurden praktisch alle Diffraktionsexperimente bei Tieftemperaturen durchgeführt. Für jeden Proteinkristall wurden die optimalen Cryobedingungen gefunden. Kristalle wurden mit einem *Cryoloop* (Durchmesser 0.1-0.3 mm) aus dem Kristallisationstropfen entnommen und vorsichtig in eine Mikrobrücke mit passendem Cryopuffer überführt. Nach dem Umbetten wurden die Kristalle wieder mit dem Cryoloop aufgenommen, auf dem Goniometer montiert und möglichst schnell in den 100K kalten N₂-Strom gebracht.

3.8 Rechenmethoden

3.8.1 Datenreduktion

Die Messdaten wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK aus dem HKL-Programmpaket (Otwinowski & Minor, 1997) indiziert, integriert und skaliert.

3.8.2 Strukturlösung und Verfeinerung

Die Kristallstruktur von dem Protein *hsCK2 α* Δ C wurde mit der Hilfe des molekularen Ersatzes gelöst. Als Suchmodell wurde *hsCK2 α* -Untereinheit aus *hsCK2*-Holoenzym (Niefind et al, 2001) verwendet. Während der Verfeinerung mit REFMAC wurden die Qualität der Modelle mit PROCHECK (Laskowski et al., 1985) auf ihre stereochemische Plausibilität geprüft. Darüber hinaus wurden mit SFCHECK (CCP4, 1994) Dichte-Korrelationskoeffizienten für alle Haupt- und Seitenkettenatome berechnet. Lieferten die

einzelnen Programme Hinweise auf stereochemische Mängel oder geringe Korrelationskoeffizienten der Elektronendichte für einzelne Reste oder Teilbereiche der Struktur, wurde das Modell in O überprüft und gegebenenfalls manuell angepaßt. Ein wichtiges Kriterium für die Beurteilung des Verfeinerungsprozesses war die Beobachtung der R-Werte. Fiel der R_{free} in vergleichbarem Maße wie der R_{work} , war dies ein Hinweis auf eine signifikante Verbesserung des Strukturmodells. Der R_{free} basiert auf dem Prinzip der Kreuzvalidierung, d. h. aus einem Teil der Daten, der bei der Verfeinerung unberücksichtigt bleibt, wird der freie R_{free} berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Überblick über die experimentelle Arbeit

Die Tabelle 6 gibt einen Blick über den experimentellen Teil der Arbeit.

Tabelle 6: Überblick über die experimentelle Arbeit (mit grau sind die durchgeführte Untersuchungen der entsprechenden Proteinen markiert).

	<i>hsCK2β</i>	<i>spCK2αC</i>	<i>hsCK2</i>	<i>hsCK2$\alpha\Delta$C</i>	<i>hsCK2$\alpha\Delta$C-V66A/M163L</i>
Präparation					
Fermentation					
Zellaufschluss					
Proteinreinigung					
<u>Kristallisation</u> Suche und Optimierung der Kristallisationsbedingungen					
Röntgenstreuungsmessung					
Interpretation der Proteinstruktur					
Kalorimetrische Messungen Bestimmung der Thermostabilität und Charakterisierung der Bindungswechselwirkungen					

4.2 Die *hsCK2αΔC*

4.2.1 Expression und Reinigung von *hsCK2αΔC*

Die Reinigung von *hsCK2αΔC* erfolgte nach dem Protokoll in Abbildung 11. Die Chromatogramme der Reinigung sind in der Abbildung 12 dargestellt. In der Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Reinigung zusammengefaßt.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ausbeuten der einzelnen chromatographischen Reinigungsschritte bei einem typischen Reinigungsgang .

Schritt	Gesamtmasse des Proteins [mg]
Zellysat	1047.2
Kationenaustausch-Chromatographie	303.6
Affinitäts-Chromatographie	100.5
Ultrafiltration	78.2
Gelpermeation	68.0
Ultrafiltration	65.52

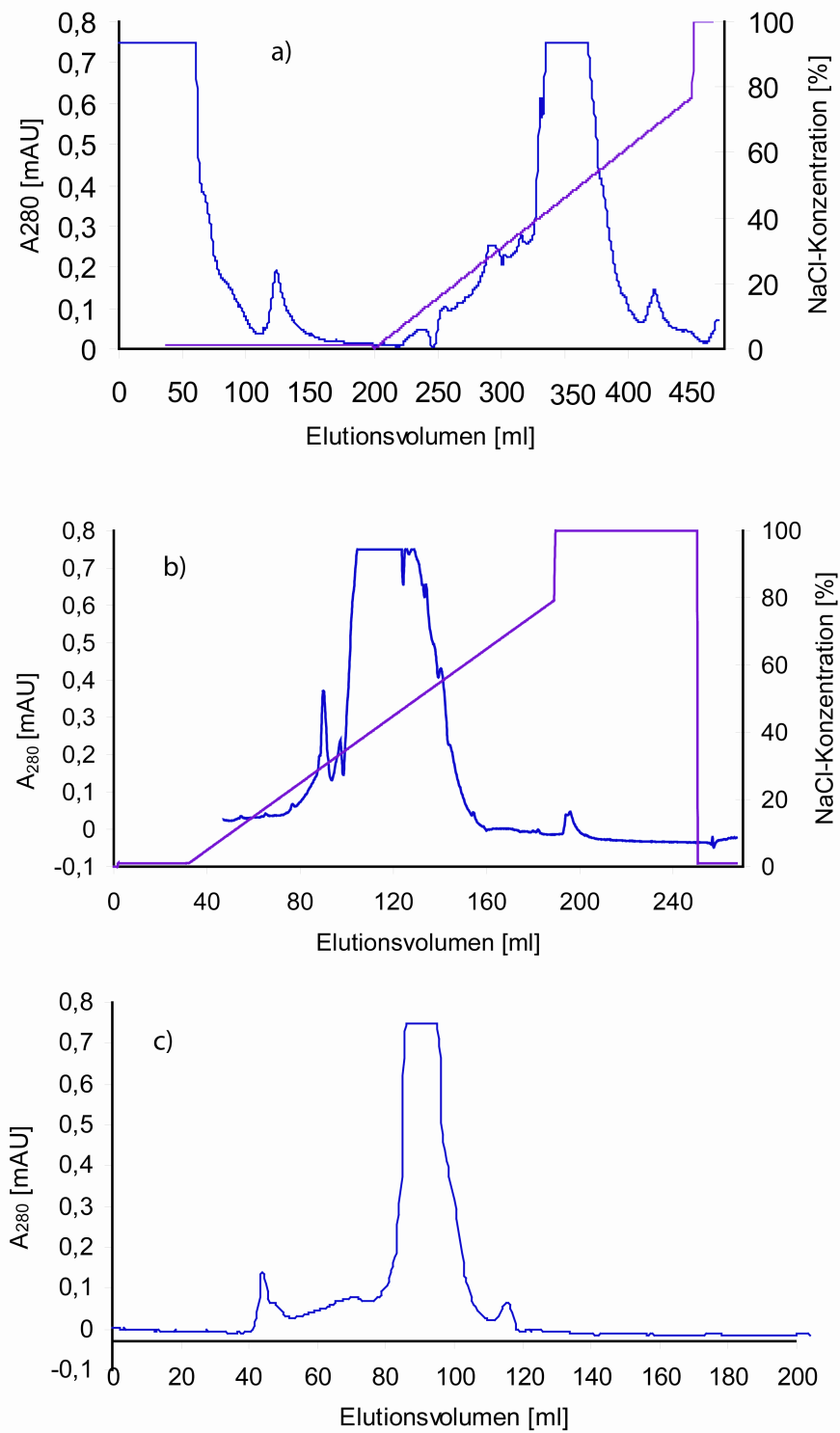


Abbildung 12: Chromatogramme der *hsCK2 α Δ C*. a) - Kationenaustausch-Chromatographie mit P11-Cellulose; b) - Affinitäts-Chromatographie mit Hi Trap Heparin HP-Säule; c) - Gelpermeations-Chromatographie mit Hi Prep Superdex 200

4.2.2 Reinheitskontrolle

4.2.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die verschiedenen Reinigungsschritte wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (Abbildung 13). Endgereinigte *hsCK2 α* Δ C zeigt jeweils nur eine einzige Bande und liefert folglich keine Hinweise auf eine Kontamination mit Fremdproteinen. Das Protein war demnach elektrophoretisch rein. Die linke Spur zeigt die Marker-Proteine, deren Größen links neben dem Gel angegeben sind.

Ferner bestätigt das SDS-Gel das aus der Sequenz berechnete Molekulargewicht der monomeren *hsCK2 α* Δ C von etwa 39 kDa.

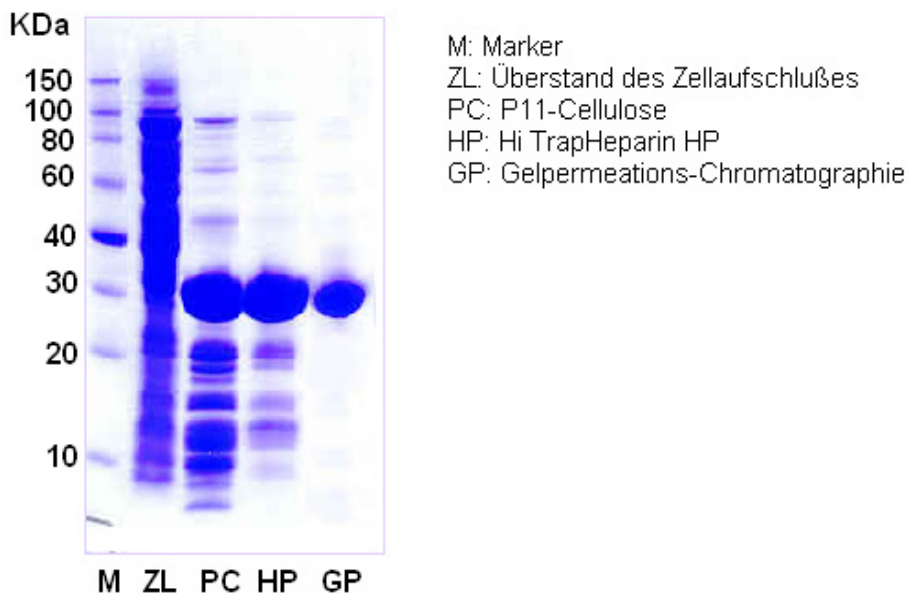


Abbildung 13: SDS-Gel. Reinheitskontrolle des Proteins *hsCK2 α* Δ C.

4.2.2.2 Massenspektrometrie

Die Reinheit des Proteins wurde außerdem mit Hilfe von Massenspektrometrie bewertet (Abbildung 14). Der Peak mit dem Molekulargewicht von 19990 Da entspricht dem zweifach geladenen Molekülion $[MH^{2+}]$, der zweite Peak mit dem Molekulargewicht von 39890 Da entspricht dem einfach geladenen Molekülion $[MH^+]$.

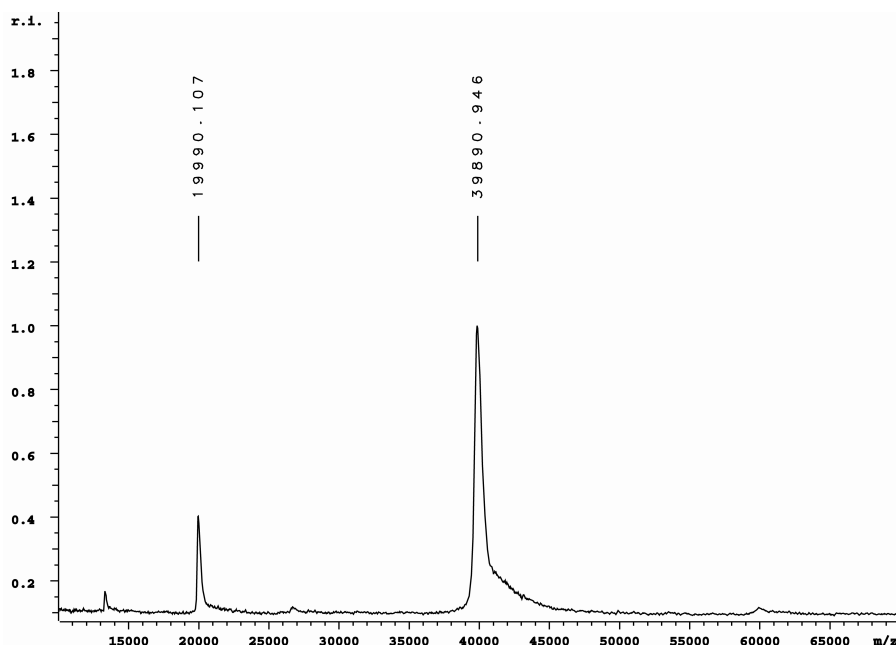


Abbildung 14: MALDI-Massenspektrum von *hsCK2αΔC*.

4.2.3 Kristallisation der *hsCK2αΔC*

Die ersten Kristalle sind bei der Kristallisationsbedingung N°26 Screen II (Hampton Research) gewachsen. Die verwendete Proteinkonzentration war 7,16mg/ml.

Die Zusammensetzung der ReservoirLösung war:

- 0.2M $(NH_4)_2SO_4$,
- 0.1M MES pH=6.5,
- 30%(w/v) PEG MME 5000.

Der Kristall ist in der Abbildung 15 (b) dargestellt. Die Kristalle von *hsCK2αΔC* zeigen die Neigung zum Verwachsen (Abbildung 15 (b), (e)). Nach der Optimierung der gefundenen Kristallisationsbedingung ist es gelungen, eine neue Form des Kristalls zu bekommen (Abbildung 15 (a)). Einer der Kristalle (ca. 0.18mm groß) wurde vermessen und gehörte zu der Raumgruppe $P2_1$. Die Ergebnisse der Strukturlösung wurden publiziert (Ermakova I. et al., 2003). Die Diffraktionsmessungen mit den Kristallen, die auf der Abbildung 15 (c) dargestellt sind, brachten als Ergebnis die Kristallstruktur, die in dieser Arbeit vorgestellt wurde. Die Kristalle gehörten auch zur Raumgruppe $P2_1$. Es ist gelungen dieses Protein in einer anderen Raumgruppe zu kristallisieren (Abbildung 15 (e)). Die Kristalle gehören zur

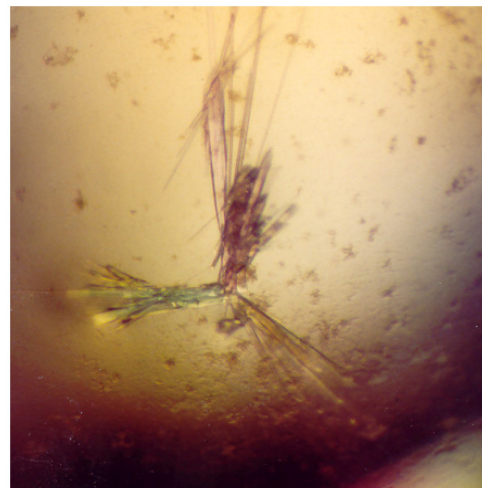
Raumgruppe P4₃. Die Kristalle waren verzwillingt, und die Auflösungsqualität ergab nicht die gewünschten Informationen über die Substrat- oder Cosubstratbindung. Die entsprechenden Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: *hsCK2αΔC*-Kristallisation. Optimierte Kristallisationsbedingungen

<i>hsCK2αΔC</i>. Raumgruppe P2₁ [Kristallfoto (a), (b)]	
Temperatur :	20°C
Proteinkonzentration:	7.2mg/ml
Proteinstammlösung:	25mM Tris/HCl, 0.2MNaCl, 1mM DTT (pH=8.5)
Reservoir:	30% (w/v) PEG MME 5000, 0.2M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1M MES (pH=7.5)
Tropfen :	3.0µl Protein + 3.0µl 2mM MgCl ₂ + 3µl 1mM AMPPNP + 1.5µl 0.62mM Peptid RRRADDSDDDDD + 1.5µl Reservoir
Methode:	sitzender Tropfen
<i>hsCK2αΔC</i>. Raumgruppe P4₃ [Kristallfoto (c)]	
Temperatur :	20°C
Proteinkonzentration:	7.2mg/ml
Proteinstammlösung:	25mM Tris/HCl, 0.2MNaCl, 1mMDTT (pH=8.5)
Reservoir:	30% (w/v) PEG MME 5000, 0.2M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1M MES (pH=7.5)
Tropfen :	
Proteinlösung:	3.0µl Protein + 3.0µl 2mM MgCl ₂ + 3µl 1mM AMPPNP + + 1.5µl 0.98mM Peptid RRRADDSDDDDD + 1.5µl Reservoir
Methode:	sitzender Tropfen
<i>hsCK2αΔC</i>. Raumgruppe [Kristallfoto (e)]	
Temperatur :	20°C
Proteinkonzentration:	5.0 mg/ml
Proteinstammlösung:	25mMTris/HCl, 0.2MNaCl, 1mMDTT (pH=
Reservoir:	30%(w/v) PEG MME 5000, 0.2M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1M MES (pH=7.5)
Tropfen :	2µl Proteinlösung + 2µl Reservoir
Proteinlösung:	0.05M MgCl ₂ + 2.4mM AMPPNP + 5mg/ml Protein + 2.5mM Peptid RRRADDSDDDDD
Methode:	sitzender Tropfen



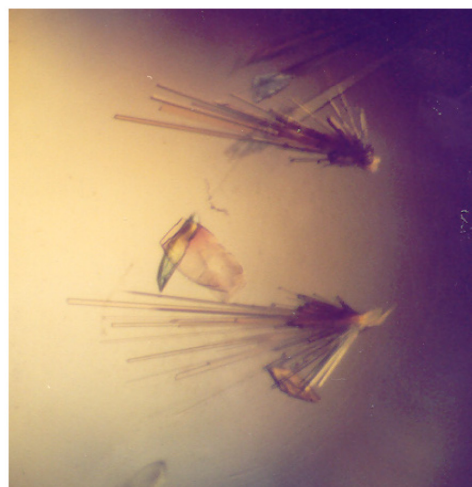
(a) - P21-Einkristalle



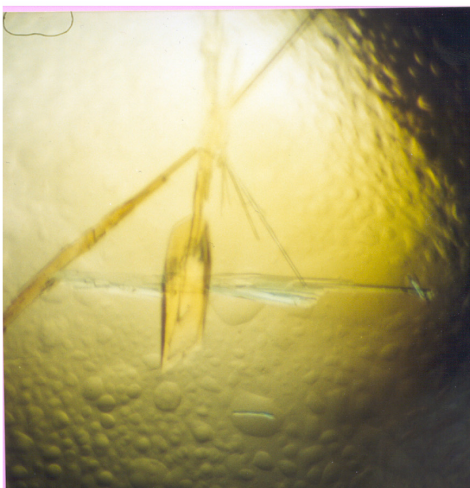
(d) - verwachsene Kristalle



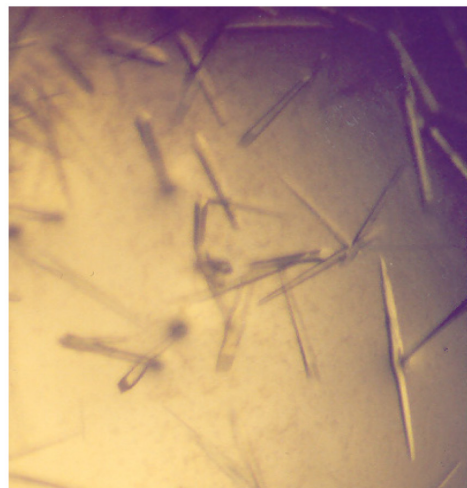
(b) - P21-Einkristalle



(e) - verwachsene Kristalle



(c) - P43-Einkristall



(f) - Nadeln (P43-Raumgruppe)

Abbildung 15: Verschiedene Kristalle von *hsCK2 α Δ C*

4.2.4 Diffraktionsmessungen

Die Datensätze wurden mit Kristallen der *hsCK2 α* C gesammelt. Eine Diffraktionsmessung wurde unter Stickstoffkühlung als Tieftemperaturdatensatz durchgeführt. Ein anderer Kristall wurde in einer Glaskapillare montiert. Die Datensammlung erfolgte mit einer Kupferdrehanode (RU 200 der Firma Rigaku) und einem MAR345 Detektor (Tabelle 9). Der erste Diffraktionsmessung ging bis 2.5 Å, beim zweiten Datensatz konnte die Auflösung von 1.8 Å -Schale erreicht werden (Abbildung 15 (a) und (b)). In der Tabelle 9 sind die Datensätze für die beiden Kristalle zusammengefasst.

Tabelle 9: *hsCK2 α* C. Die Messparameter der MR Datensätze

	Datensatz N°1	Datensatz N°2
höchste Auflösung [Å]	2.5	1.8
Wellenlänge[Å]	1.5418	1.5418
Kristall-Detektor [mm]	150	110
Rotation pro Bild [°]	1.0	1.0
Bilder	100	242
Detektor	MAR345	MAR345
Temperatur [K]	283	100

Der erste Datensatz wurde bei 283K erhalten. Vor den Messungen wurde der Kristall in einer Glaskapillare montiert. Die erreichte Auflösung (2.5Å) war nicht befriedigend. Die Kristallqualität verschlechterte sich während der Messungen relativ schnell. Trotzdem war der Datensatz komplett. Es war sinnvoll, die passenden Cryobedingungen zu finden, um Tieftemperaturmessungen durchzuführen. Der Kristall (Foto (c)) ist in der Anwesenheit des Fällungsmittels PEG MME 5000 gewachsen. Die PEG MME 5000 -Konzentration von 30% war jedoch nicht hoch genug, um die Eisringbildung zu vermeiden. Es ist gelungen, durch schrittweise Erhöhung der PEG MME 5000-Konzentration auf 40% dieses Problem zu lösen. Die zweite Messung wurde bei 100K durchgeführt. Das Diffraktionsbild des Datensatzes bis 1.8 Å ist in Abbildung 16 dargestellt.

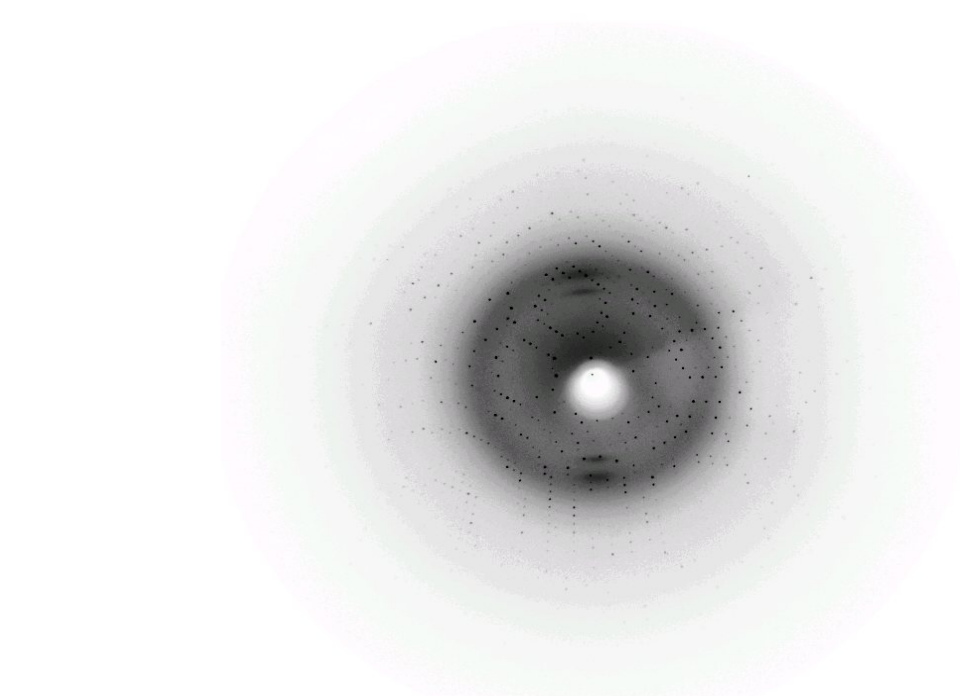


Abbildung 16: Die Beugungsaufnahme eines Datensatzes für den Binärenkomplex *hsCK2 α ΔC* / AMPPNP.

Tabelle 10: Statistiken der Datensätzen von *hsCK2 α ΔC*-Kristallen

Datensatz	Kristall N°1	Kristall N°2
Temperatur [K]	283	100
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁
Gitterkonstanten: a, b, c [Å] α , β , γ [°]	59.04, 45.60, 64.26 90.00, 112.02, 90.00	58.68, 45.36, 63.40 90.00, 112.02, 90.00
V_M -Wert [Å ³ /Da]	2.1	2.1
Lösungsmittelanteil [%]	39.6	38.6
Zahl der Protomeren in der asymmetrischen Einheit	1	1
Auflösung [Å]	17.3 – 2.5	40.0 – 1.80
Vollständigkeit [%] (letzte Schale)	98.5 (99.9)	99.8 (98.4)
Zahl der einzelnen Reflexen	11207	31602
Rsym [%] (letzte Schale)	11.8 (60.2)	7.4 (43.5)

4.2.5 Untersuchung der Kristallpackung

Die Berechnung der Packungsdichte wurde mit dem Programm MATTHEWS_COEF (CCP4, 1994; Matthews, 1968; Kantardjeff K.A., 2003) für die beiden Datensätze durchgeführt.

Das Ergebnis ist der als Matthew-Parameter bekannte Wert V_M [Å³/Da] und lag bei beiden Kristallen nahe 2,1. Anhand dieses Wertes kann bei bekannter Größe der Elementarzelle

eines Proteinkristalls sowie bekannter Raumgruppe die Anzahl der Proteinmoleküle pro asymmetrischer Einheit abgeschätzt werden.

$$V_M = \frac{V_{AE}}{M_P \cdot n_{Prot}} \quad (21)$$

Wobei V_{AE} – Volumen der asymmetrischen Einheit [\AA^3], M_P – Molekulargewicht des Proteins [Da] und n_{Prot} – Anzahl der Proteinmoleküle pro asymmetrischer Einheit sind.

Es ergab sich ein Monomer pro asymmetrischer Einheit (Abbildung 17) mit einem Lösungsmittelanteil zwischen 38 – 40%, was mit dem durchschnittlichen Lösungsmittelanteil von Kristallen der Raumgruppe $P2_1$ übereinstimmt (Andersson K.M & Hovmüller S., 2000).

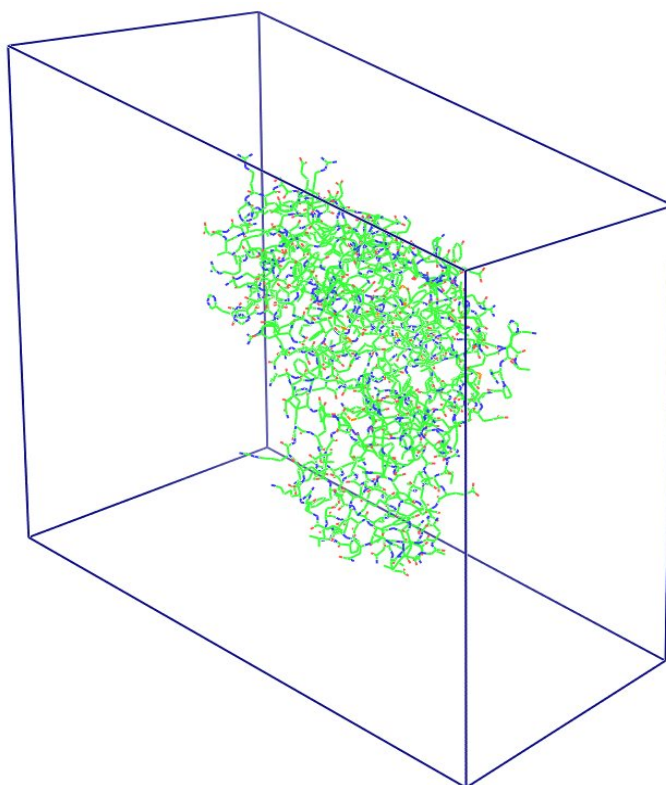


Abbildung 17: Anzahl der *hsCK2αΔC*-Monomeren pro asymmetrischer Einheit.

4.2.6 Strukturverfeinerung

Die Strukturverfeinerung der beiden Proteine wurde in mehreren Schritten mit den Programmen O und REFMAC durchgeführt. Eine Zusammenfassung der einzelnen Schritte der Verfeinerung für den Kristall N°2 ist in der Tabelle 11 dargestellt. Nach einer Starre-Körper-Verfeinerung („*rigid_body_refinement*“) wurden die folgende R-Werte erreicht: R_{work} – 36.4%, R_{free} – 35.2%. Anschließend wurden die einzelnen Atomkoordinaten und B-Faktoren freigegeben. Nach dem Wassereinbau wurden die R-Werte entsprechend auf 21.2% und 26.2% reduziert. Nach dem Einbau des Cofaktors und der Sulfationen folgten noch einige

Verfeinerungsschritte, die die R-Werte entsprechend bis 21.0% und 25.2% zu reduzierten.

Tabelle 11: Darstellung der wichtigsten Schritte der Strukturverfeinerung des Kristalls *hsCK2αΔC*.

Schritt	Verfeinerungsparameter	Programm	Anzahl der weiteren Atome	Rwork [%]	Rfree [%]
1	„rigid-body-refinement“	REFMAC	0	36.4	35.2
2	Wassersuche	REFMAC	0	21.2	26.2
3	Einbau des Cofaktors	REFMAC	0	21.8	26.3
4	Einbau von SO_4^{2-}	REFMAC	2 SO_4^{2-}	21.0	25.2

4.2.7 Stereochemische Qualität der ermittelten Struktur

Die Struktur des binären Komplexes *hsCK2αΔC*/AMPPNP konnte bis zu einer Auflösung von 1.8 Å gelöst werden. Als Beispiel der Dichtequalität wird der Bereich um Tyr211 und Arg312 in der Abbildung 18 dargestellt.

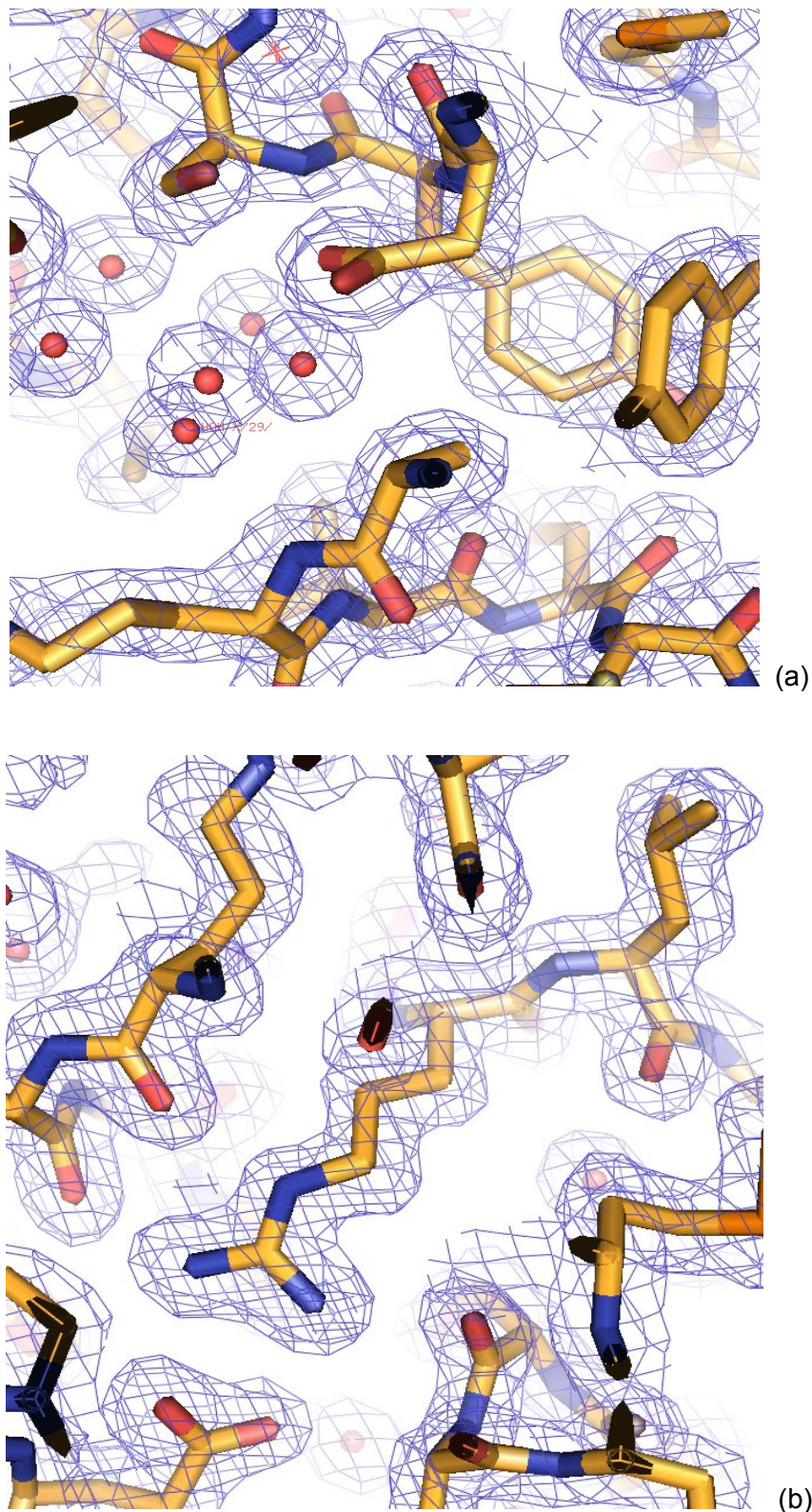


Abbildung 18: Elektronendichte des Aminosäurerestes Tyr 211 (a) und des Aminosäurerestes Arg 312 (b) bei einer Konturierung von 1.2σ . Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt.

In einem Ramachandranplot (Ramachandran, 1965) sind die charakteristischen γ - und ψ -Werte des $C\alpha$ -Rückgrats dargestellt. Bestimmte Winkelkombinationen kommen besonders häufig vor und sind sterisch bevorzugt, andere sind sterisch ungünstig. Aus diesem mit PROCHECK (Laskowski et al., 1992) ermittelten Diagramm ist zu erkennen, daß sich 91%

der Aminosäuren in der erlaubten Region befinden. Die Aminosäure Ala193 liegt in dem nicht günstigen Bereich des Diagramms. Die Statistik dieses Diagramms ist in der Tabelle 12 dargestellt.

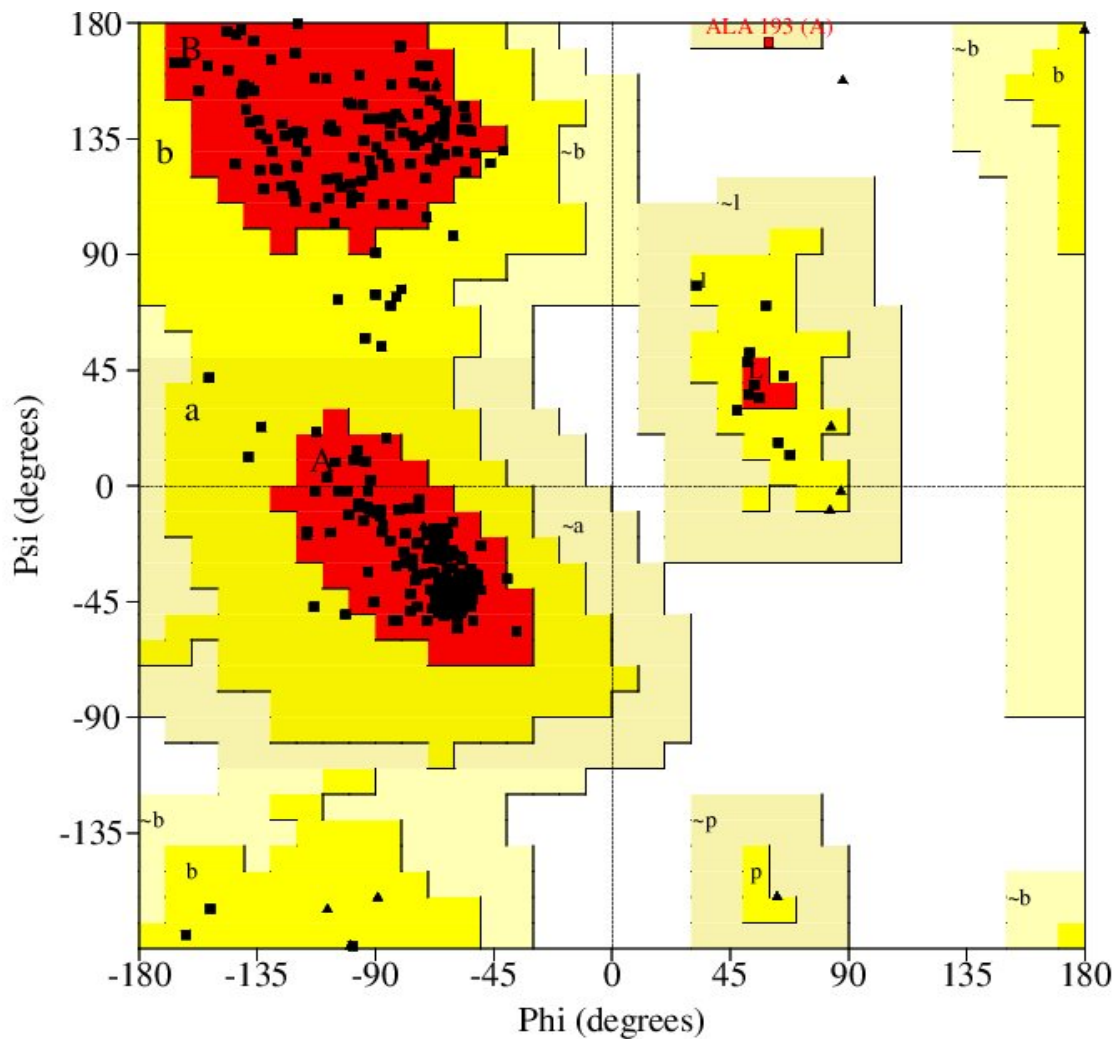


Abbildung 19: Ramachandran-Diagramm der endverfeinerten Struktur der *hsCK2αΔC* bei 1.8Å. A, B, L: erlaubte Regionen; a, b, l, p: erweitert erlaubte Regionen; ~a, ~b, ~l, ~p: großzügig erlaubte Regionen. Glycine sind als Dreiecke dargestellt.

Tabelle 12: Ramachandran-Plot der *hsCK2αΔC*.

AS in erlaubten Regionen [A, B, L]	274 (89.4%)
AS in erweitert erlaubten Regionen [a, b, l, p]	26 (8.6%)
AS in großzügig erlaubten Regionen [~a, ~b, ~l, ~p]	1 (0.3%)
AS in nicht-erlaubten Regionen [XX]	0 (0.0%)
Anzahl von Nicht-Glycin- und Nicht-Prolin-AS	301 (100%)
Anzahl an Glycinen	14
Anzahl an Prolinen	14
Gesamtanzahl an AS	456

4.2.8 Kalorimetrische Untersuchungen der *hsCK2αΔC* in der Anwesenheit von SO_4^{2-} -Ionen

Die kalorimetrischen Untersuchungen der *hsCK2αΔC*-Thermostabilität in der Anwesenheit von 0.2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ geben noch einen deutlichen Hinweis auf die Wechselwirkung zwischen der *hsCK2αΔC*-Untereinheit und SO_4^{2-} -Ionen. Das Protein wird schon viel stabiler bei der Zugabe von 0.2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Abbildung 20).

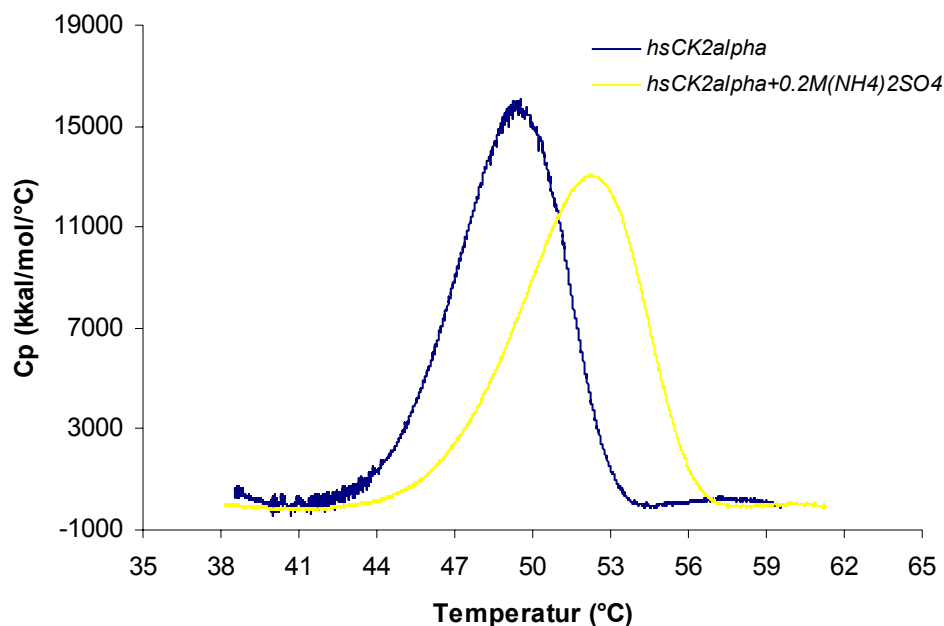


Abbildung 20: Die Abhängigkeit der *hsCK2αΔC*-Thermostabilität von der SO_4^{2-} -Ionen-Anwesenheit.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zeigt einen stabilisierenden Effekt auf die *hsCK2αΔC*. *hsCK2αΔC* alleine hat einen Schmelzpunkt bei 49.44°C. Die Zugabe von 0.2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erhöht die Temperatur des Überganges bis zu 52.9°C.

4.3 *hsCK2αΔC*-V66A/M163L

4.3.1 Ausgangsbedingungen

Die *hsCK2αΔC*-V66A/M163L wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. O.-G. Issinger am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Syddansk Universität (Odense, Dänemark) produziert. *hsCK2αΔC*-V66A/M163L ist eine Mutante der katalytischen Untereinheit *hsCK2αΔC*, bei der die Aminosäuren Val 66 und Met 163 entsprechend durch Ala und Ile ersetzt wurden. Diese Mutante wurde auf der Basis der verschiedenen bekannten Strukturen

von *zmCK2α* im Komplex mit den unterschiedlichen ATP-kompetitiven Liganden geplant und hergestellt, um die duale Co-Substratspezifität der Proteinkinase CK2 zu erklären.

4.3.2 Reinheitskontrolle

4.3.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Das Protein *hsCK2αΔC-V66A/M163L* ergab eine starke Bande um 40 kDa auf dem SDS-Gel. Man kann auch eine Vielzahl von schwachen Banden anderer Proteine auf dem SDS-Gel beobachten, die offensichtlich bei der Kristallisation nicht gestört haben (Abbildung 21).

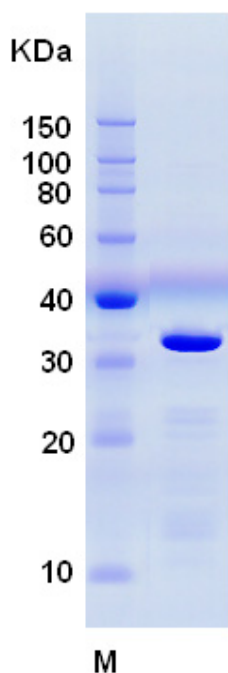


Abbildung 21: SDS-Gel. Kontrolle der *hsCK2αΔC-V66A/M163L*-Reinheit vor der Kristallisation.

4.3.2.2 Massenspektrometrie

Das Massenspektrum eines MALDI-TOF-Experiments der *hsCK2αΔC-V66A/M163L*-Untereinheit ist in der Abbildung 22 dargestellt. Der Peak mit dem Molekulargewicht von 39645 Da entspricht dem einfach geladenen Molekülion $[MH^+]$.

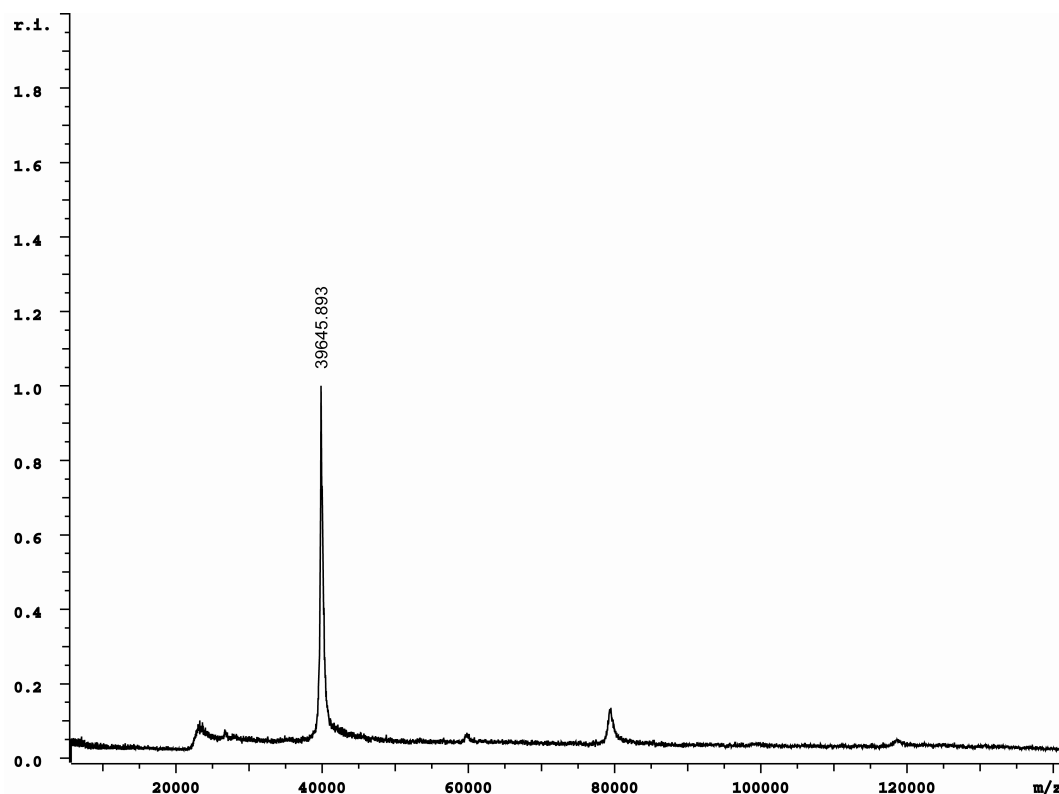


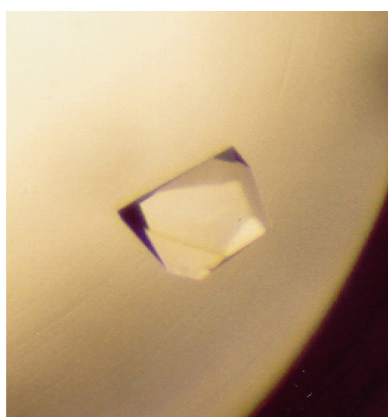
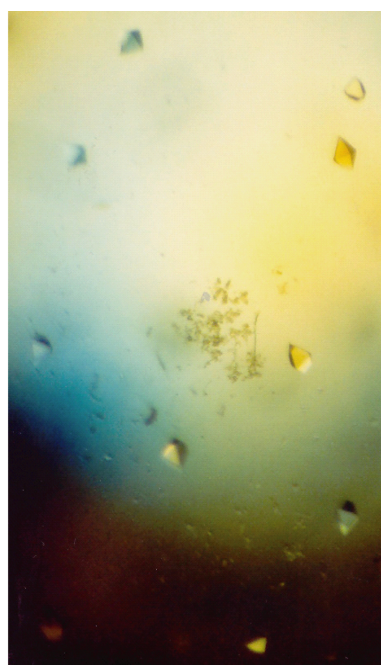
Abbildung 22: Massenspektrum eines MALDI-TOF-Experimentes der *hsCK2αΔC-V66A/M163L*.

4.3.3 Kristallisation der *hsCK2αΔC-V66A/M163L*

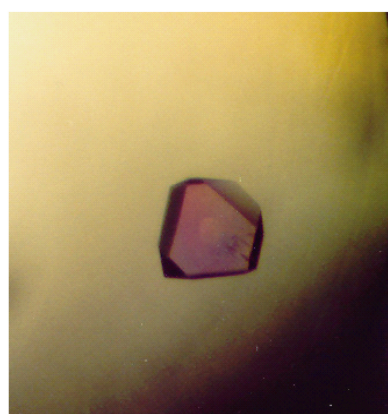
Um die Kristallisationsbedingungen für die *hsCK2αΔC-V66A/M163L* zu finden, wurden die faktoriellen Screens mit 196 unterschiedlichen Lösungen verwendet (Screen 1, Screen 2, Lite Screen, *Hampton Research*). Die Bildung der ersten Kristallen erfolgte aus der folgenden Lösung: 1.6M *tri*-Na-Citrat*2H₂O (pH=6.5). Die Prüfung von Lösungen mit unterschiedlichen *tri*-Na-Citrat-Konzentrationen bei 100K in einem N₂-Strahl hat gezeigt, daß Na-Citrat schon bei einer Konzentration von 2.1M als Cryo-Schutzmittel dienen kann. Versuche, die Kristalle bei dieser *tri*-Na-Citrat-Konzentration zu erzeugen, waren erfolgreich. Die optimierten Kristallisationsbedingungen und die Kristallfotos sind in Tabelle 13 und Abbildung 23 dargestellt.

Tabelle 13: Optimierte Kristallisationsbedingungen von *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L*

<i>hsCK2$\alpha$$\Delta$C-V66A/M163L</i> (RaumgruppeP4₃) [Kristallfoto: Abbildung 23 (a)]	
Temperatur :	20°C
Proteinkonzentration:	3.74mg/ml
Proteinstammlösung:	25mM Tris/HCl, 0.4MNaCl, 1mM DTT (pH=8.5)
Reservoir:	2,3M <i>tri</i> -Na-Citrate (pH=6.3)
Tropfen :	3.0 μ l Protein + 3.0 μ l 2mM MgCl ₂ + 3 μ l 1mM AMPPNP + 1.5 μ l 0.62mM Peptid RRRADDSDDDDD + 1.5 μ l Reservoir
Methode:	sitzender Tropfen

(a) - P4₃21₂-Einkristall
(ohne Polarisationsfilter)

(c) - Mikrokristalle

(b) - P4₃21₂- Einkristall
(mit Polarisationsfilter)**Abbildung 23:** Kristalle von *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L*.

4.3.4 Diffraktionsmessungen

Die Diffraktionsmessungen von *hsCK2 α ΔC-V66A/M163L*-Kristalle wurden mit den am Institut zur Verfügung stehenden Drehanoden mit Cu-K α -Strahlung und unter Verwendung von Synchrotronstrahlung am EMBL in Hamburg vermessen. Die Datensätze der in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen wurden alle bei 100 K gemessen: sowohl die Röntgenquellen am Institut, als auch die Meßplätze am EMBL waren mit Cryostream Cooler 600 Cryoanlagen von Oxford Cryosystems, Oxford, UK, ausgestattet. Die Mutterlauge (2.3M *tri*-Na-Citrate*2H₂O pH=6.3) diente als Cryo-Schutzhilfsmittel.

Tabelle 14: Die Messparameter der MR Datensätze

	Datensatz N°1	Datensatz N°2
höchste Auflösung [Å]	2.3	1.8
Wellenlänge[Å]	1.5418	1.5418
Kristall-Detektor [mm]	200	279.3
Rotation pro Bild [°]	1.0	2.33
Bilder	74	450
Detektor	MAR345	MAR CCD
Temperatur [K]	283	100

Der erste Datensatz der *hsCK2 α ΔCΔN*, der zu einer der beiden Strukturlösungen führte, wurde an der dem Institut zur Verfügung stehenden Anlage gemessen. Der zweite Datensatz wurde an der EMBL-Außenstelle am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg gemessen. Das Diffraktionsbild des Datensatzes N°2 bis 1.6 Å ist auf dem Abbildung 24 dargestellt.

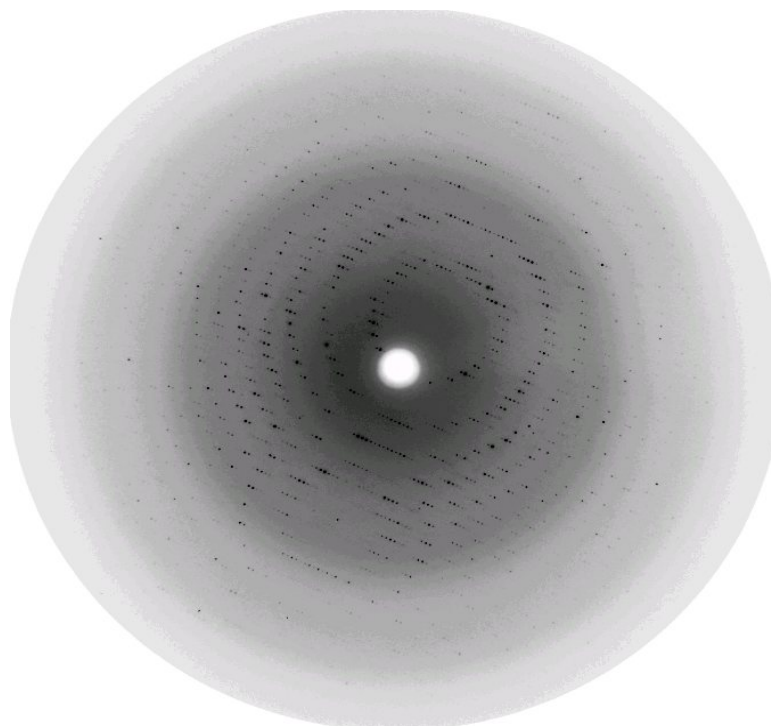


Abbildung 24: Die Beugungsaufnahme eines Datensatzes der *hsCK2 α* -V66A/M163L.

Tabelle 15: Statistiken der Datensätzen von *hsCK2 α* -V66A/M163L -Kristallen

Datensatz	Kristall N°1	Kristall N°2
Temperatur [K]	283	100
Raumgruppe	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Gitterkonstanten: a, b, c [Å] α , β , γ [°]	71.45, 71.45, 135.09 90.00, 90.00, 90.00	71.36, 71.36, 126.44 90.00, 90.00, 90.00
V_M -Wert [Å ³ /Da]	2.2	2.1
Lösungsmittelanteil [%]	43.9	39.9
Zahl der Protomeren in der asymmetrischen Einheit	1	1
Auflösung [Å]	63.3 – 2.3	62.0 – 1.6
Vollständigkeit [%] (letzte Schale)	99.4 (100)	99.7 (99.9)
Zahl der einzelnen Reflexen	16150	36631
R_{sym} [%] (letzte Schale)	5.5 (46.5)	4.4 (33.2)

Untersuchung der Kristallpackung

Die Berechnung der Packungsdichte wurde mit dem Programm MATTHEWS_COEF (CCP4, 1994; Matthews, 1968; Kantardjeff K.A., 2003) für die beiden Datensätze durchgeführt.

Unter der Annahme, daß sich ein Monomer in der asymmetrischen Einheit befindet, ergaben sich ein V_M -Wert von $2.1[\text{\AA}^3/\text{Da}]$ und ein Lösungsmittelanteil von 43.9% für Kristall N°1 und 39.9% für Kristall N°2.

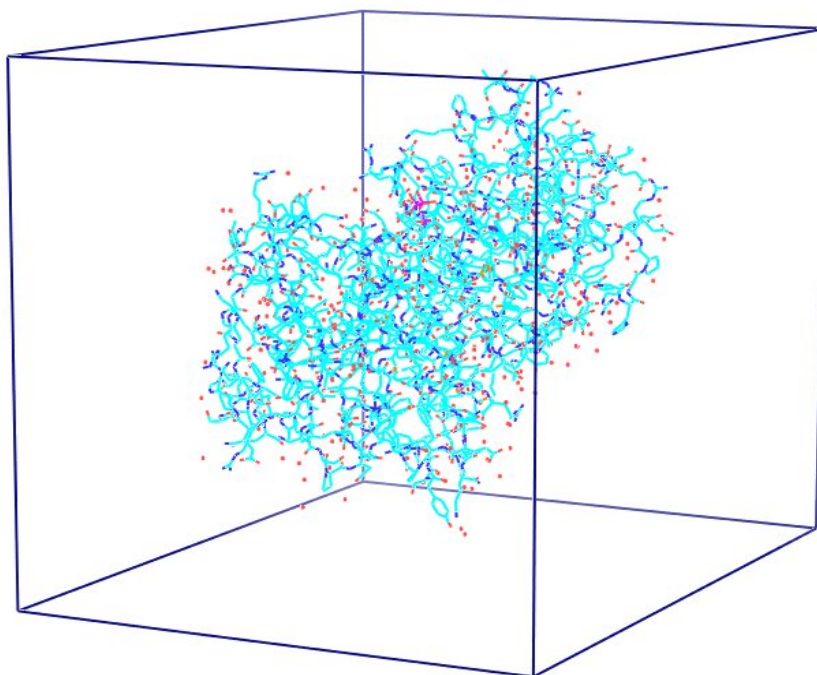


Abbildung 25: Anzahl der *hsCK2 α* Δ C-V66A/M163L -Monomeren pro asymmetrischer Untereinheit. Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt.

Strukturverfeinerung

Die Strukturverfeinerung der beiden Proteine wurde in mehreren Schritten mit den Programmen O, Refmac durchgeführt. Eine Zusammenfassung der einzelnen Schritte der Verfeinerung für den Kristall N°2 ist in der Tabelle 16 dargestellt. Nach einer Starre-Körper-Verfeinerung („*rigid_body_refinement*“) wurden die folgenden R-Werte erreicht: R_{work} – 36.4%, R_{free} – 35.2%. Nach dem Wassereinbau bei „*restrained refinement*“ wurden die R-Werte entsprechend bis 21.2% und 26.2% reduziert. Nach dem Einbau des Cofaktors folgten noch einige Verfeinerungsschritte, die die R-Werte entsprechend bis 21.0% und 25.2% reduzieren.

Tabelle 16: Darstellung der wichtigen Schritten der Strukturverfeinerung des Kristalls *hsCK2 α ΔC-V66A/M163L* (Kristall N°2).

Schritt	Verfeinerungsparameter	Programm	Anzahl der weiteren Atome	Rwork [%]	Rfree [%]
1	„rigid-body-refinement“	REFMAC	0	41.09	38.51
2	Austausch der Aminosäuren Val66Ala und Met163Leu	REFMAC	0	28.34	28.92
3	Einbau des Co-Substrates	REFMAC	0	24.43	27.31
4	Wassersuche	REFMAC	0	19.53	23.45

Stereochemische Qualität der ermittelten Struktur

Die Struktur des binären Komplexes *hsCK2 α ΔC-V66A/M163L* / AMPPNP wurde bis zu einer Auflösung von 1.6Å gelöst werden. Als Beispiel der Dichtequalität soll die FOFC_Dichte von Trp216 und in der Nähe liegender Aminosäuren der Abbildung 26 dienen.

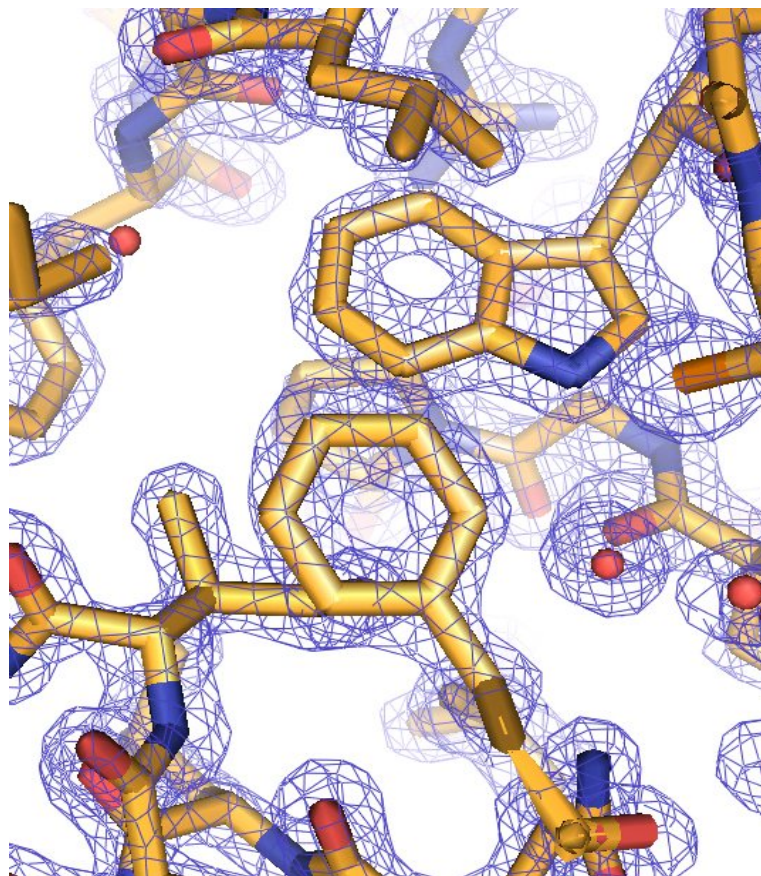


Abbildung 26: Elektronendichte des Aminosäurerestes Trp216 bei einer Konturierung von 1.0 σ . Die Abbildung wurde mit PyMol erstellt.

In der Abbildung 27 sind die ausgetauschten Aminosäuren dargestellt. Man beobachtet, daß nach der Mutationen die entsprechende Elektronendichtebereiche sind korrekt mit den Aminosäuren gefüllt.

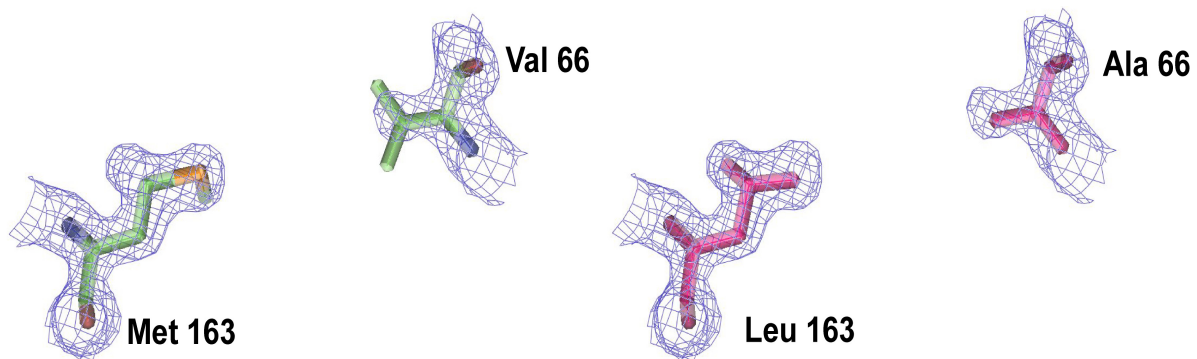


Abbildung 27: Die durchgeführte Mutationen: M163L und V66A. Bunt – Aminosäuren in *hsCK2 α Δ C*, rosa – ausgetauschte entsprechende Aminosäuren in *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L*.

In einem Ramachadranplot (Ramachadran, 1965) sind die charakteristischen θ - und ψ -Werte des $\text{C}\alpha$ -Rückgrats dargestellt. In der erlaubten Region befinden sich 91.8 % aller Aminosäuren. Die Aminosäure Ala 193 befindet sich in der nicht erlaubten Bereich des Diagramms. Die Statistik dieses Diagramms ist in der Tabelle 17 dargestellt.

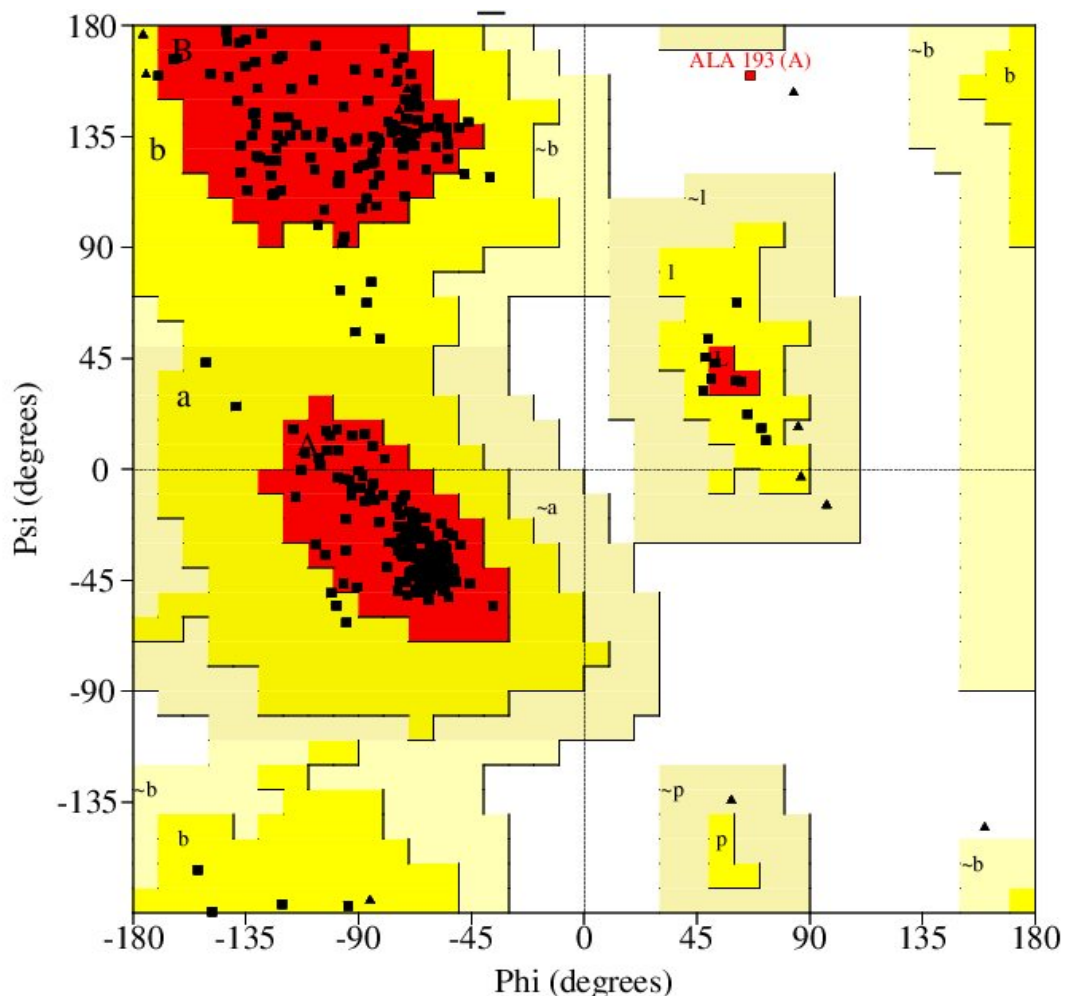


Abbildung 28: Ramachadran-Diagramm der endverfeinerten Struktur der *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L* - bei 1.6Å. A, B, L: erlaubte Regionen; a, b, l, p: erweitert erlaubte Regionen; ~a, ~b, ~l, ~p: großzügig erlaubte Regionen. Glycine sind als Dreiecke dargestellt.

Tabelle 17: Ramachadran-Plot der *hsCK2 α* C-V66A/M163L.

AS in erlaubten Regionen [A, B, L]	279 (91,8%)
AS in erweitert erlaubten Regionen [a, b, l, p]	24 (7,9%)
AS in großzügig erlaubten Regionen [\sim a, \sim b, \sim l, \sim p]	0 (0.0%)
AS in nicht-erlaubten Regionen [XX]	1 (0.3%)
Anzahl von Nicht-Glycin- und Nicht-Prolin-AS	304 (100%)
Anzahl an Glycinen	218
Anzahl an Prolinen	15
Gesamtanzahl an AS	14

4.4 *hsCK2*

4.4.1 Expression und Reinigung des *hsCK2*-Holoenzym

Die Reinigung der *hsCK2* erfolgte nach einem in Abbildung 11 zusammengefaßten Protokoll. *hsCK2 α* C- und *hsCK2 β* -Untereinheiten wurden getrennt exprimiert. Nach der Zellyse wurden beide Lysate zusammengemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurde die Dreischrittreinigung durchgeführt. Die Chromatogramme der Aufreinigung sind in der Abbildung 29 dargestellt. In der Tabelle 18 sind die Ergebnisse der Aufreinigung zusammengefaßt.

Tabelle 18: *hsCK2*. Zusammenfassung der Ausbeuten der einzelnen chromatographischen Reinigungsschritte.

Schritt	Gesamtmasse des Proteins [mg]
Zelllysate	1230.36
Kationenaustausch-Chromatographie	625.43
Affinitäts-Chromatographie	128.44
Ultrafiltration	75.76
Gelpermeation	23.46
Ultrafiltration	18.32

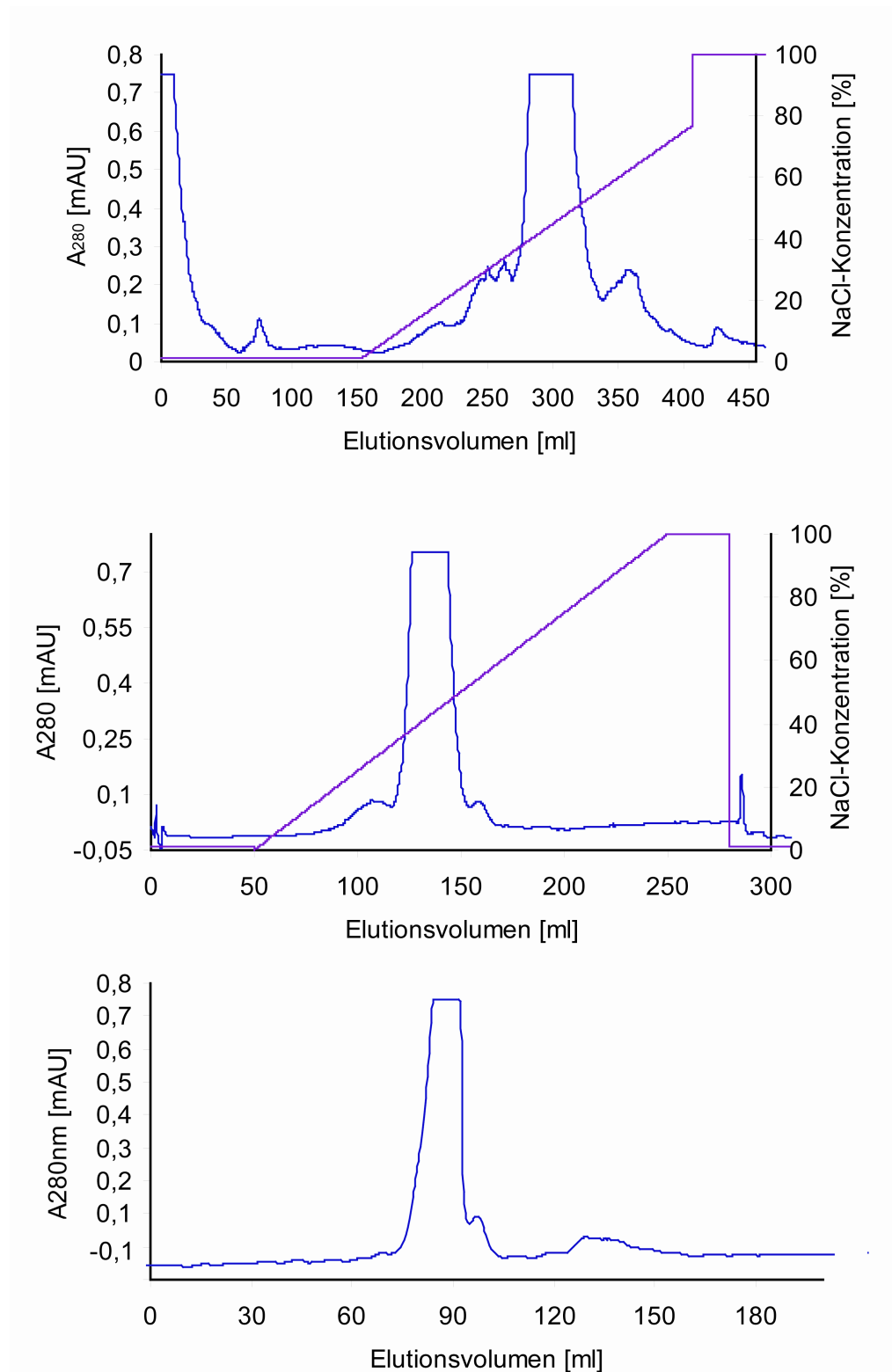


Abbildung 29: Chromatogramme der *hsCK2*. a) - Kationenaustausch-Chromatographie mit P11-Cellulose; b) - Affinitäts-Chromatographie mit Hi Trap Heparin HP; c) - Gelpermeations-Chromatographie mit Hi Prep Superdex 200

4.4.2 Reinheitskontrolle

4.4.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

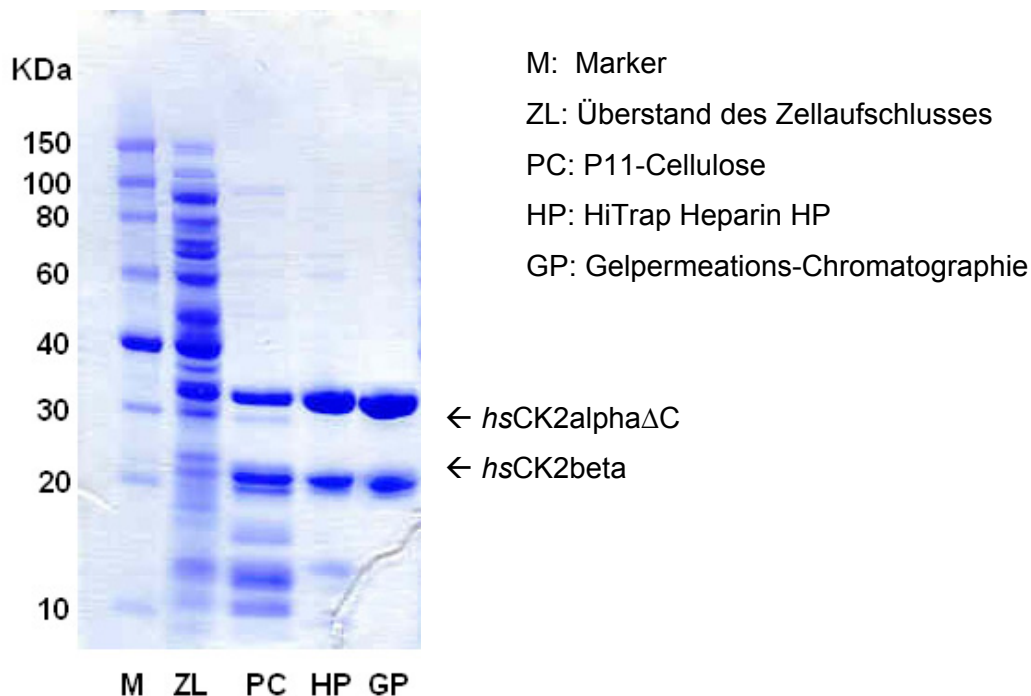


Abbildung 30: SDS-Gel. Verlauf der *hsCK2*-Aufreinigung.

Nach der P11-Cellulose-Säule waren auf dem SDS-Gel (Abbildung 30) zwei starke Banden für die *hsCK2* α -Untereinheit um 39 kDa und für die *hsCK2* β -Untereinheit um 25 kDa sowie eine Vielzahl weiterer Proteinbanden zu beobachten. Nach dem zweiten Reinigungsschritt waren auf dem SDS-Gel noch einige schwächere Banden im niedrigmolekularen Bereich zu erkennen, die durch den nachfolgenden Reinigungsschritt – die Gelpermeations-Chromatographie entfernt werden konnten.

4.4.2.2 Massenspektrometrie

Das Massenspektrum eines MALDI-TOF-Experiments ist auf der Abbildung 31 dargestellt. Im MALDI-TOF-Spektrum werden zwei Peaks bei einem m/z -Wert von 40317 Da und 25242 Da detektiert. Die Peaks entsprechen den beiden Komponenten des Holoenzym, den *hsCK2* $\alpha\Delta C$ - und *hsCK2* β -Untereinheiten.

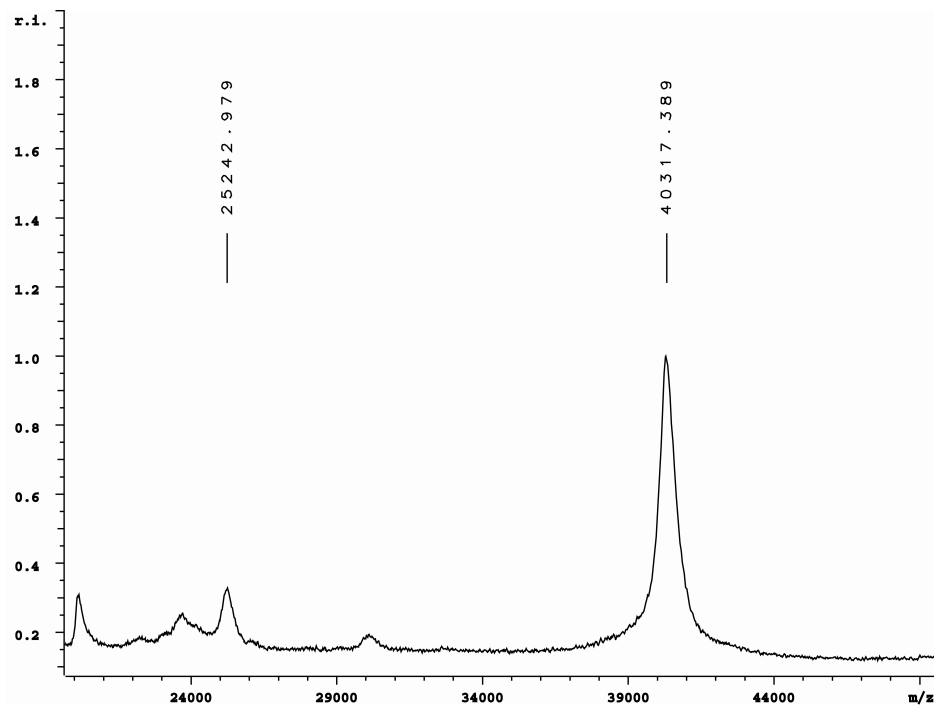
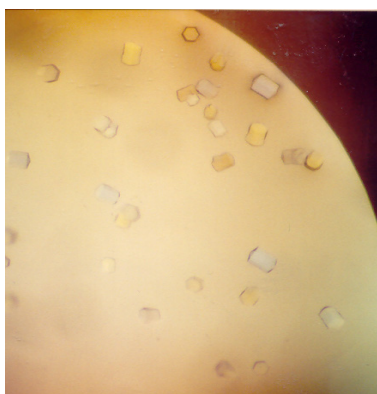


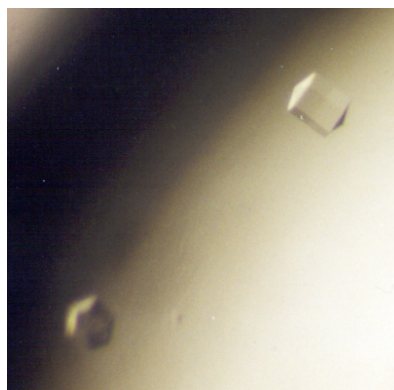
Abbildung 31: Massenspektrum eines MALDI-TOF-Experimentes des *hsCK2*-Holoenzym.

4.4.3 Kristallisation der *hsCK2*

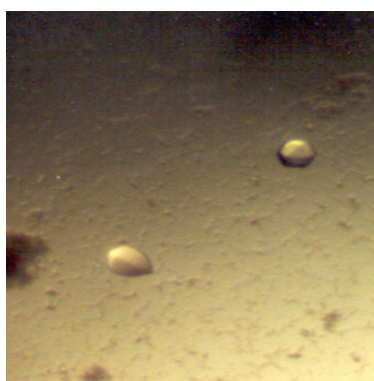
Es wurden zahlreiche Versuche vorgenommen, um das Protein *hsCK2* mit einem Peptid RRRADDSDDDDD cozukristallisieren. Die *hsCK2*-Kristalle zeigten die Tendenz zum Verwachsen. Die guten, gleichmäßig gewachsenen Kristalle ergaben nur sehr niedrige (bis 6,5Å) Auflösungen bei der Röntgendiffraktion. Die Abbildung 32 und die Tabelle 19 zeigen einige Kristallfotos und die entsprechende Kristallisationsbedingungen.



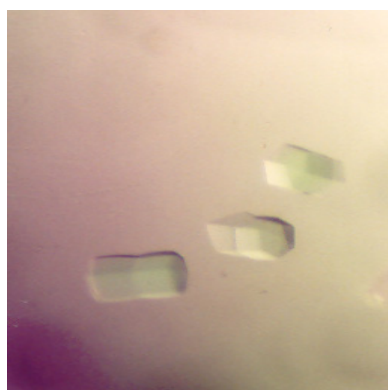
(a) – Einkristalle



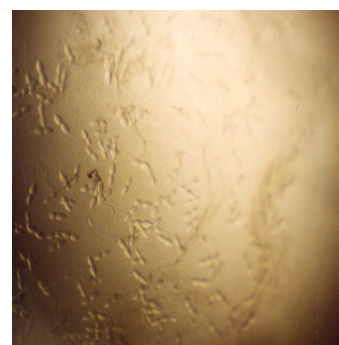
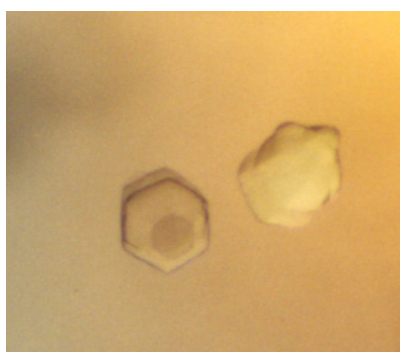
(b) – Einkristalle



(c) – Einkristalle



(d) – verwachsene Kristalle



(e), (f), (g) – verwachsene Kristalle

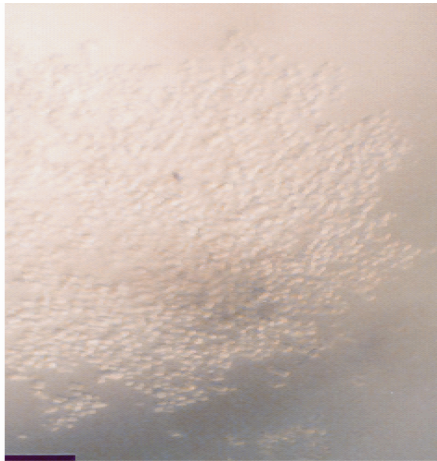
Abbildung 32: Unterschiedliche Kristalle der Proteinkinase *hsCK2*.

Tabelle 19: Optimierte Kristallisationsbedingungen von *hsCK2*

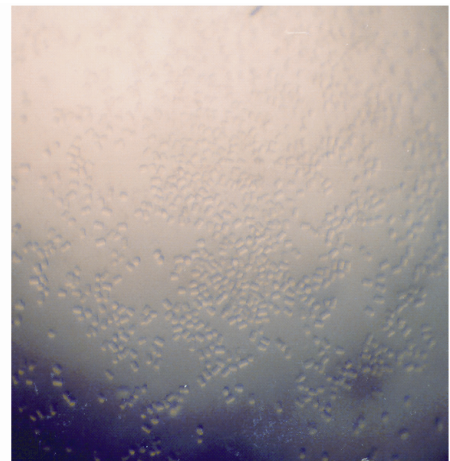
<i>hsCK2</i> [Kristallfoto: Abbildung 32(c)]	
Temperatur :	12°C
Proteinkonzentration:	4.78mg/ml
Proteinstammlösung:	25mM Tris/HCl, 0.5M NaCl, 1mM DTT (pH=8.5)
Reservoir:	40% MPD 0.1M Bicine pH=9.0
Tropfen :	1.5µl Protein + 1.5µl 2mM MgCl ₂ + 1.5µl 1mM AMPPNP + 0,75µl Reservoir + 0,75µl 0.65mM Peptid RRRADDSDDDDD
Methode:	sitzender Tropfen
<i>hsCK2</i> [Kristallfoto: Abbildung 32(b)]	
Temperatur :	12°C
Proteinkonzentration:	4.78mg/ml
Proteinstammlösung:	25mM Tris/HCl, 0.5M NaCl, 1mM DTT (pH=8.5)
Reservoir:	15% PEG MME 550 0.1M Bicine pH=8.5 0.1M NaCl
Tropfen :	1.5µl Protein + 1.5µl 2mM MgCl ₂ + 1.5µl 1mM AMPPNP + 0,75µl Reservoir + 0,75µl 0.65mM Peptid RRRADDSDDDDD + 0.5µl 0.1M L-Cystein
Methode:	sitzender Tropfen
<i>hsCK2</i> [Kristallfoto: Abbildung 32(e)]	
Temperatur :	20°C
Proteinkonzentration:	4.78mg/ml
Proteinstammlösung:	25mM Tris/HCl, 0.5M NaCl, 1mM DTT (pH=8.5)
Reservoir:	15% PEG 8000 0.1M Tris/HCl pH=8.5 0.2M Li ₂ SO ₄
Tropfen :	3.0µl Protein + 1.5µl 5mM MgCl ₂ + 1.5µl 2.5mM AMPPNP + 0,75µl Reservoir + 0,75µl 1.2mM Peptid RRRADDSDDDDD
Methode:	sitzender Tropfen

Spermin ist einer der bekanntesten Wechselwirkungspartner der Proteinkinase CK2. Die Bindung von Spermin an CK2 erhöht ihre enzymatische Aktivität, vermutlich durch Veränderung der Quartärstruktur. Die Co-Kristallisation von *hsCK2* und Spermin kann sehr sinnvoll sein, um diese Wirkung mit Hilfe einer Kristallstruktur zu erklären.

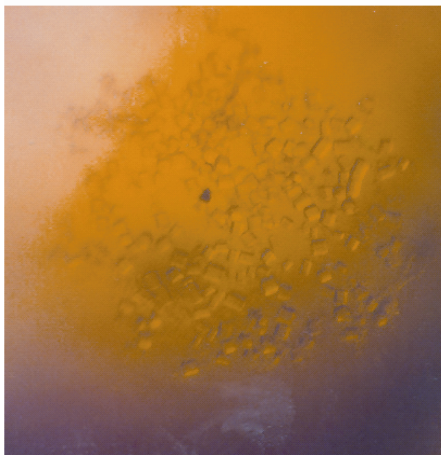
Das Ergebnis der ersten Kristallisationsversuche waren Mikrokristalle. Es ist gelungen, die Kristallisationsbedingungen zu optimieren und größere Kristalle zu bekommen. Diese Kristalle besaßen dennoch keine Streukapazität. Die Optimierung der Kristallisationsbedingungen ist in der Abbildung 33 und in Tabelle 20 dargestellt.



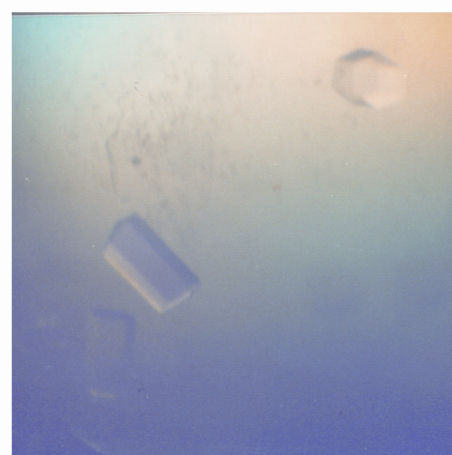
(a) - Anfangsbedingungen



(b) - 1. Optimierungsschritt



(d) - 2. Optimierungsschritt



(e) - 3. Optimierungsschritt

Abbildung 33: Optimierung der Kristallisationsbedingungen von *hsCK2*-Holoenzym in der Spermin-Anwesenheit

Tabelle 20: Optimierte Kristallisationsbedingungen von *hsCK2* in der Anwesenheit von Spermin.

<i>hsCK2</i> / Spermin [Kristallfoto Abbildung 33(a)]	
Temperatur :	20°C
Proteinkonzentration:	4.0mg/ml
Proteinstammlösung:	25mM Tris/HCl, 0.5M NaCl, 1mM DTT (pH=8.5)
Reservoir:	0.1M Bicine pH=9.0, 0.1M NaCl, 20% PEG MME 550
Tropfen :	1.5µl Protein + 1.5µl 5mMMgCl ₂ + 1.5µl 2.5mM AMPPNP + 1.5µl 5mM Spermin + 0,75µl Reservoir
Methode:	sitzender Tropfen
<i>hsCK2</i> / Spermin [Kristallfoto Abbildung 33(b)]	
Temperatur :	20°C
Proteinkonzentration:	4.0mg/ml
Proteinstammlösung:	25mM Tris/HCl, 0.5M NaCl, 1mM DTT (pH=8.5)
Reservoir:	0.1M Bicine pH=9.0, 0.1M NaCl, 20% PEG MME 550
Tropfen :	1.5µl Protein + 1.5µl 5mMMgCl ₂ + 1.5µl 2.5mM AMPPNP + 1.5µl 5mM Spermin + 0,75µl Reservoir + 0.7µl Anapoe C ₁₃ E ₈
Methode:	sitzender Tropfen
<i>hsCK2</i> / Spermin [Kristallfoto Abbildung 33(c)]	
Temperatur :	20°C
Proteinkonzentration:	8.0mg/ml
Proteinstammlösung:	25mM Tris/HCl pH=8.5 0.5M NaCl 1mM DTT (pH=8.5)
Reservoir:	0.1M Bicine pH=9.0, 0.1M NaCl, 20% PEG MME 550
Tropfen :	1.5µl Protein + 1.5µl 2.5mM MgCl ₂ + 1.5µl 2.5mM AMPPNP + 1.5µl 5mM Spermin + 0,75µl Reservoir + 0.7µl Anapoe C ₁₃ E ₈
Methode:	sitzender Tropfen
<i>hsCK2</i> / Spermin [Kristallfoto Abbildung 33(c)]	
Temperatur :	20°C
Proteinkonzentration:	11.45mg/ml
Proteinstammlösung:	25mM Tris/HCl pH=8.5 0.5M NaCl 1mM DTT (pH=8.5)
Reservoir:	0.1M Bicine pH=9.0, 0.1M NaCl, 20% PEG MME 550
Tropfen :	1.5µl Protein + 1.5µl 2.5mM MgCl ₂ + 1.5µl 2.5mM AMPPNP + 1.5µl 5mM Spermin + 0,75µl Reservoir + 0.7µl Anapoe C ₁₃ E ₈
Methode:	sitzender Tropfen

4.5 *spCK2 α*

4.5.1 Expression und Reinigung der *spCK2 α*

Die Reinigung von *spCK2 α* erfolgte nach dem Protokoll in Abbildung 11. Die Chromatogramme der Reinigung sind in der Abbildung 34 dargestellt. In der Tabelle 21 sind die Ergebnisse der Reinigung zusammengefasst.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ausbeuten der einzelnen chromatographischen Reinigungsschritte.

Schritt	Gesamtmasse des Proteins [mg]
Zellysat	1256.43
Kationenaustausch-Chromatographie	138.72
Kationenaustausch-Chromatographie	32.49
Ultrafiltration	17.45

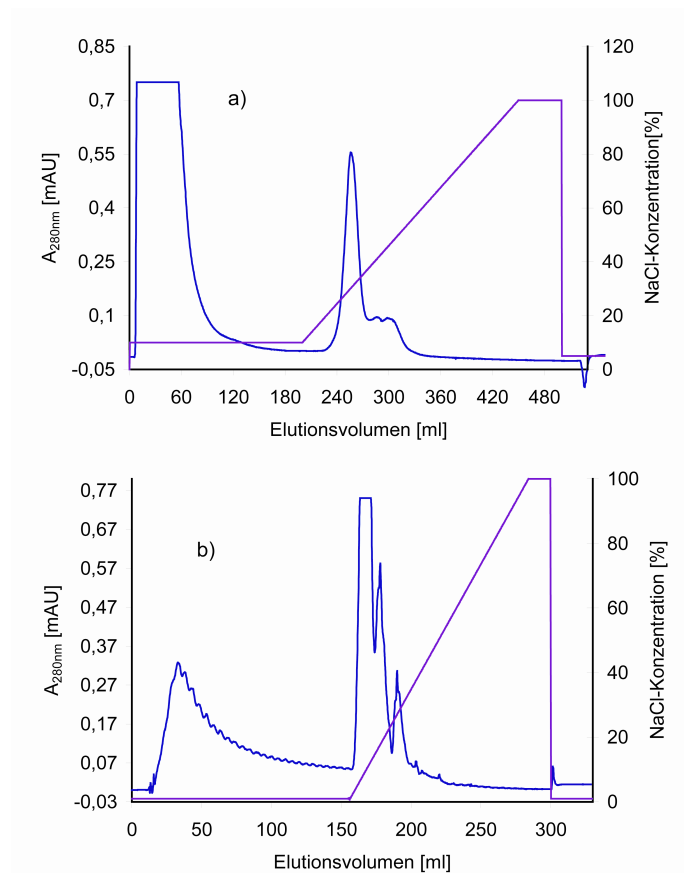


Abbildung 34: Chromatogramme der *spCK2 α* . a) - Kationenaustausch-Chromatographie mit CM-Sepharose; b) - Kationenaustausch-Chromatographie mit Resource S

4.5.2 Reinheitskontrolle

4.5.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

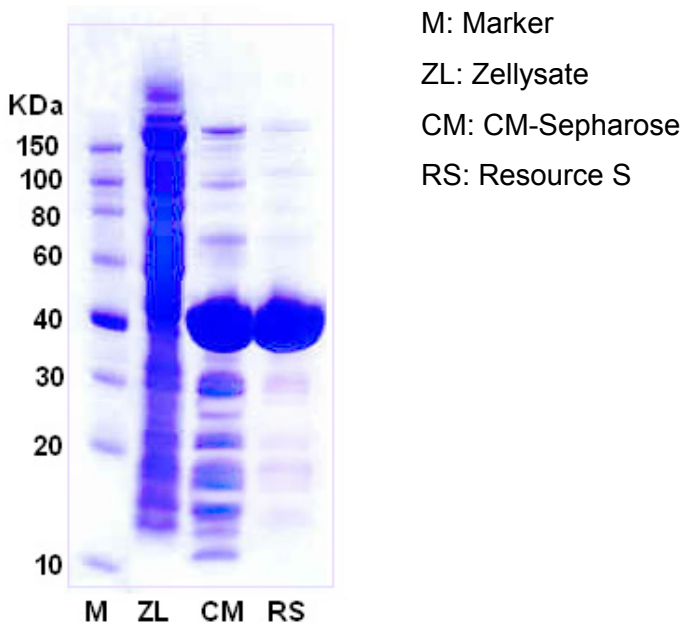


Abbildung 35: SDS-Gel. Verlauf der *spCK2α*-Reinigung

Nach dem ersten Chromatographieschritt der zweistufigen Reinigung waren auf dem SDS-Gel eine starke Bande um 40 kDa zu beobachten sowie die Vielzahl der Banden von anderen Proteinen, die durch die nachfolgende Anionenaustausch-Chromatographie mit der Hilfe von Resource S-Säule entfernt werden konnten (Abbildung 35).

4.5.2.2 Massenspektrometrie

Die Reinheit der *spCK2α* wurde zusätzlich durch ein MALDI-TOF-Experiment analysiert. Ein solches Spektrum ist in Abbildung 36 dargestellt. Der Molekülionpeak wird bei einem m/z -Wert von 39531 Da detektiert. Daneben kann man bei einem Verhältnis von 19788 Da das zweifach geladene Molekülion beobachten. Zur Kalibrierung wurde ein externer Trypsinogen-Standard verwendet.

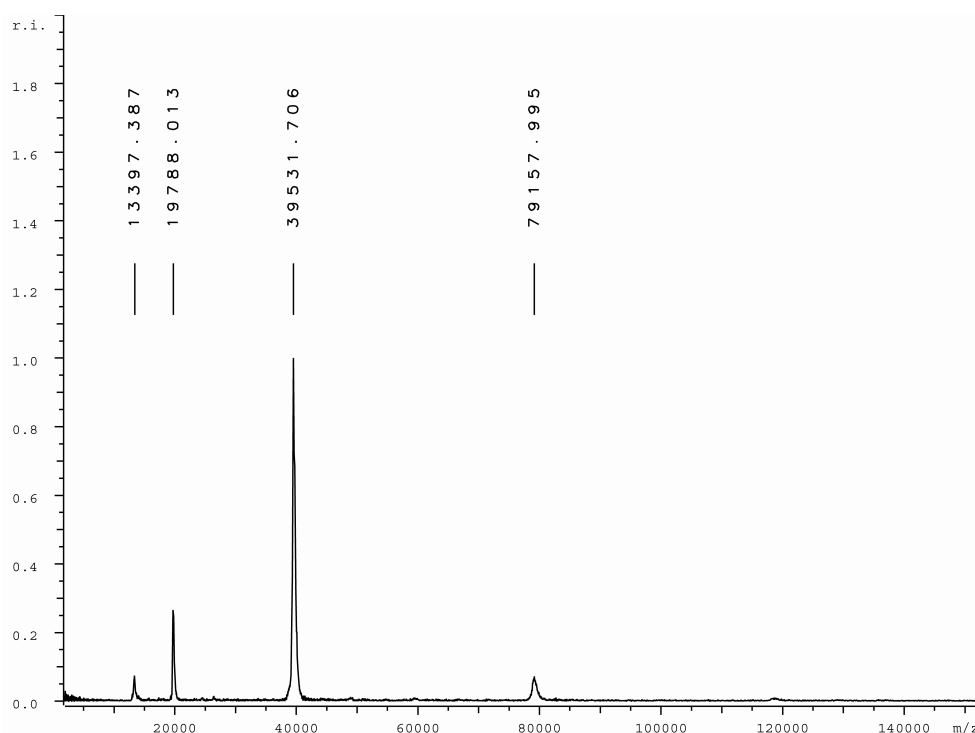


Abbildung 36: Massenspektrum eines MALDI-TOF-Experimentes der *spCK2α*.

4.5.3 Kristallisation der *spCK2α*

Schon die ersten Kristallisationsversuche mit dem Protein *spCK2α* waren erfolgreich. Das einzige Problem war, daß das Kristallwachstum zu schnell war. Schon 30 min nach dem Pipettieren konnte man unter dem Mikroskop das Entstehen von ersten Mikrokristallen beobachten. Fast genauso schnell gingen die Kristalle kaputt und schon nach zwei Tagen waren die Kristalle aufgelöst. Eine von mehreren Möglichkeiten, Kristalle zu stabilisieren, ist die Zugabe von Osmolyten, also von Molekülen, die in der Natur für den Schutz der Organismen vor Stress durch hohen osmotischen Druck verwendet werden. Meistens stabilisieren Osmolyte die Proteine *in vivo* und *in vitro*, ohne die Proteinkonformation zu ändern. Glycerin gehört auch dazu (Weinkauf S., et al., 2001; Singh S. & Singh J., 2003). Die Untersuchungen von der Thermostabilität des Proteins *spCK2α* in der Abwesenheit und Anwesenheit von Glycerin haben gezeigt, daß sich die Thermostabilität des Proteins in Glycerin-Anwesenheit erhöht (Abbildung 37).

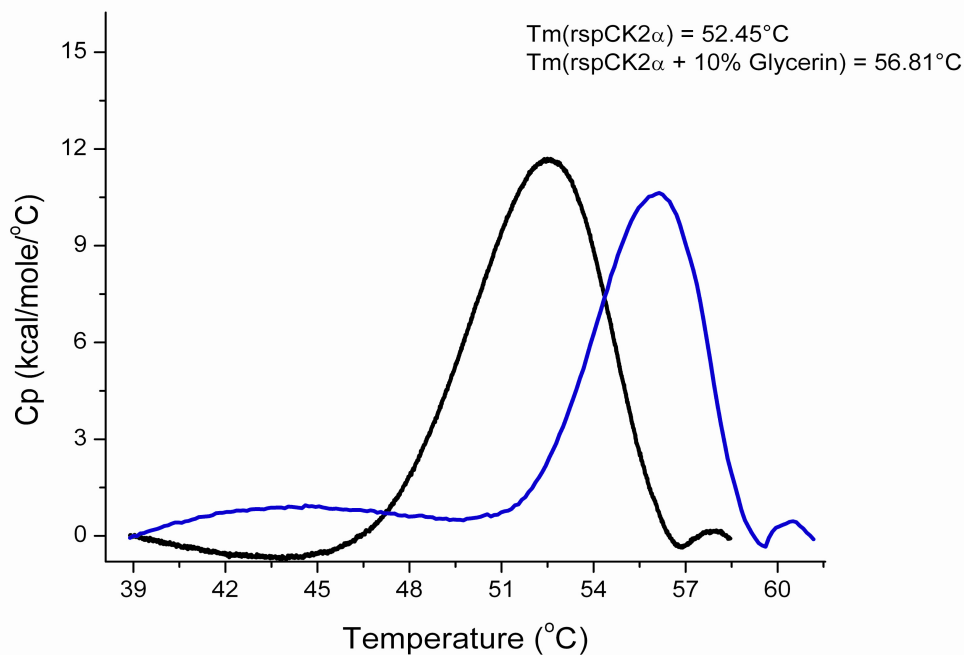
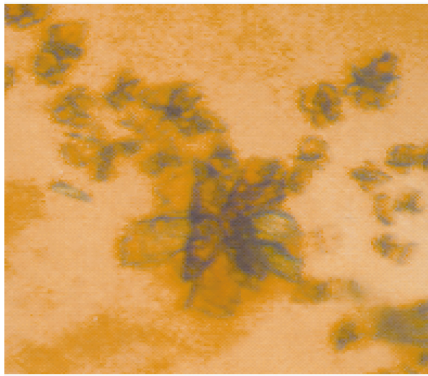


Abbildung37: Abhängigkeit der $\text{spCK2}\alpha$ -Thermostabilität von der Glycerin-Anwesenheit. Der Schmelzpunkt in der Anwesenheit von 10% Glycerin verschiebt sich auf 4°C . Das Protein ist wesentlich stabiler, als in der Glycerin- Anwesenheit.

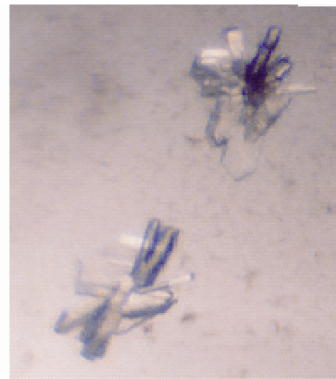
Außerdem wurden, um die Geschwindigkeit des Kristallwachstums zu verlangsamen, die weiteren Kristallisationsversuche bei 12°C statt bei 20°C durchgeführt. Die ersten Kristalle waren verwachsen und wuchsen in Spheruliten-Form. Bei den optimierten Kristallisationsbedingungen wuchsen Einkristalle, die aber keine Streukapazität aufwiesen. In Abbildung 38 und in Tabelle 22 sind die Kristallfotos und die Kristallisationsbedingungen dargestellt.

Tabelle 22: Einige Kristallisationsbedingungen für *spCK2α*.

<i>spCK2α</i> [Kristallfoto: Abbildung 38(b)]	
Temperatur :	20°C
Proteinkonzentration:	8.78mg/ml
Proteinstammlösung:	50mM Tris/HCl, 0.5M NaCl, 10% Glycerin (pH=7.5)
Reservoir:	20% MPD, 0.1M Tris/HCl (pH = 8.0)
Tropfen :	2.0µl Protein + 1.5µl 2mM MgCl ₂ + 1.5µl 1mM AMPPNP + 0.5µl 0.62mM Peptid RRRADDSDDDDD + 0.75µl Reservoir
Methode:	sitzender Tropfen
<i>spCK2α</i> [Kristallfoto: Abbildung 38(e)]	
Temperatur :	12°C
Proteinkonzentration:	8.78mg/ml
Proteinstammlösung:	50mM Tris/HCl, 0.5M NaCl, 10% Glycerin (pH=7.5)
Reservoir:	20% MPD, 0.1M Tris/HCl (pH = 7.5)
Tropfen :	2.0µl Protein + 1.5µl 2mM MgCl ₂ + 1.5µl 1mM AMPPNP + 0.75µl 0.62mM Peptid RRRADDSDDDDD + 1.5µl Reservoir + 1µl 50% Glycerin
Methode:	sitzender Tropfen



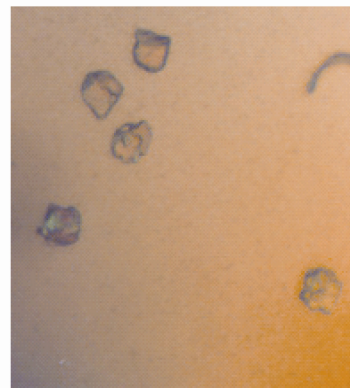
(a) - verwachsene Kristalle (Spherulite)



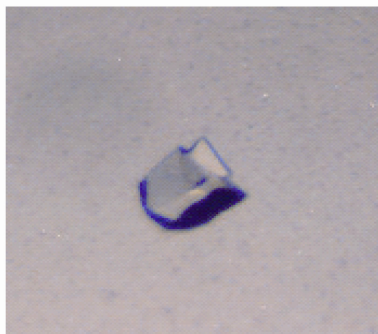
(b) - verwachsene Kristalle



(c) - verwachsene Kristalle



(d) - verwachsene Kristalle



(e) - Einkristall

Abbildung 38: Verschiedene Kristalle der *spCK2 α* .

4.5.4 *spCK2 α* . Diffraktionsmessungen

Es ist dennoch gelungen die Diffraktionsmessungen mit verwachsenen *spCK2 α* -Kristallen durchzuführen. Die verwachsenen Spherulite wurden vorsichtig in der Mitte mit einer Nadel getrennt und die einzelnen Kristalle gemessen. Die Messungen wurden bei 100K durchgeführt. Die Datensammlung erfolgte mit einer Kupferdrehanode (RU 200 der Firma Rigaku) und einem MAR345 Detektor. Das Ergebnis war jedoch nicht ausreichend gut, um die Kristallstruktur von diesem Protein zu lösen. Die Kristalle haben bis 3.5Å gestreut und

wiesen sehr hohe Mosaizität (bis 1.9°) auf. Die Abbildung 39 stellt die Beugungsaufnahme eines Datensatzes der *spCK2 α* dar.

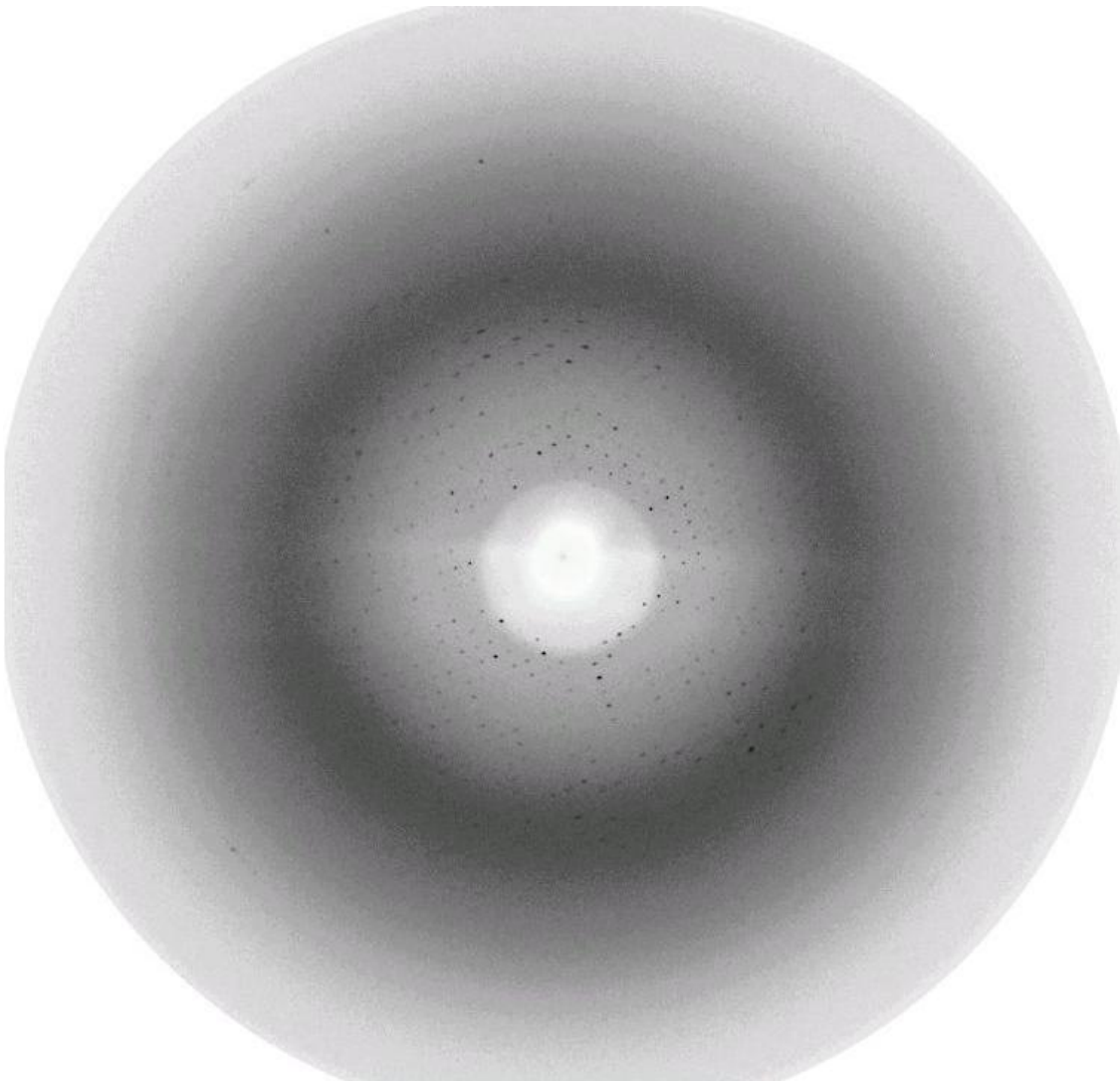


Abbildung 39: Die Beugungsaufnahme eines Datensatzes der *spCK2 α*

4.6 *hsCK2 β*

4.6.1 Expression und Reinigung der *hsCK2 β*

Die Herstellung der *hsCK2 β* war notwendig für die Durchführung der kalorimetrischen Experimente. Die Reinigung der *hsCK2 β* erfolgte nach dem Protokoll in Abbildung 11. Die Chromatogramme der Reinigung sind in Abbildung 40 dargestellt. In Tabelle 23 sind die Ergebnisse der Reinigung zusammengefaßt.

Tabelle 23: *hsCK2 β* . Zusammenfassung der Ausbeuten der einzelnen chromatographischen Reinigungsschritte.

Schritt	Gesamtmasse des Proteins [mg]
Zelllysat	1235.45
Kationenaustausch-Chromatographie	324.87
Affinitäts-Chromatographie	76.54
Ultrafiltration	53.92

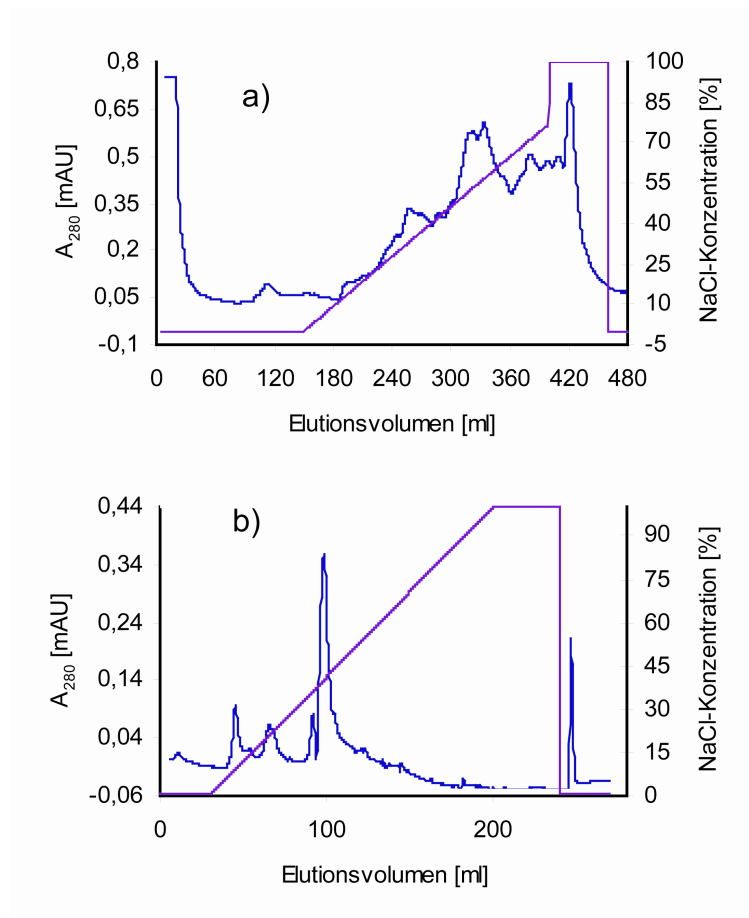


Abbildung 40: Chromatogramme der *hsCK2 β* . a)- Kationenaustausch-Chromatographie mit P11-Cellulose ; b) - Affinitäts-Chromatographie mit HiTrap Sepharose HP

4.6.2 Reinheitskontrolle

Massenspektrometrie

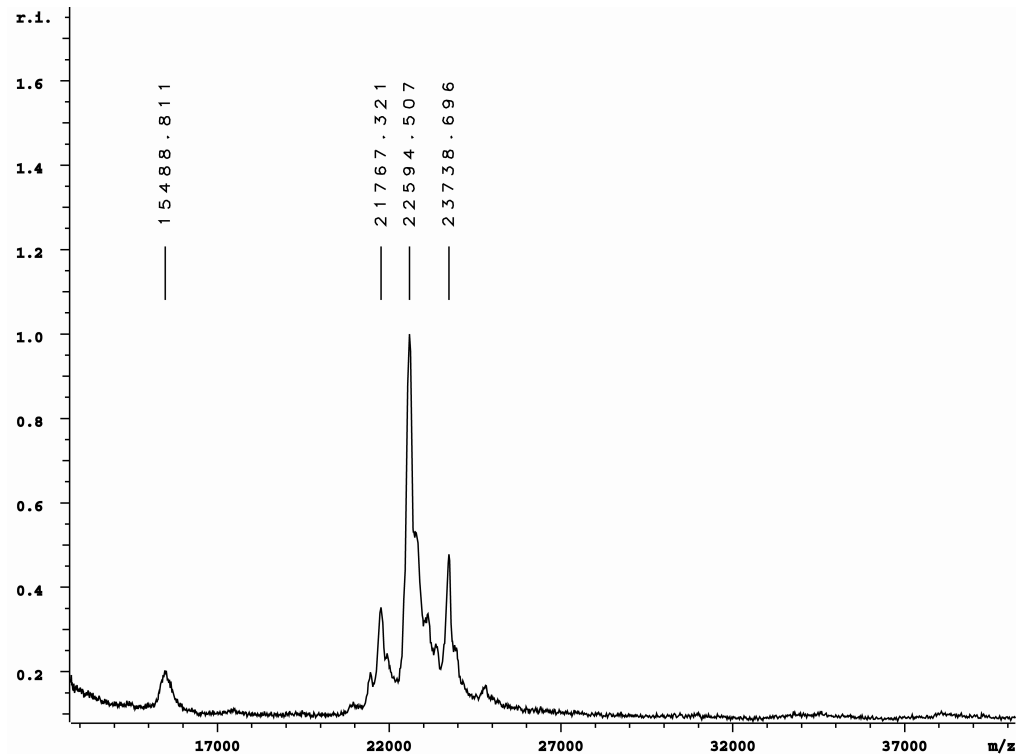


Abbildung 41: Ein Massenspektrum eines MALDI-TOF –Experimentes der *hsCK2β*.

4.7 Kalorimetrische Studien

4.7.1 Isothermale Titrationskalorimetrie

Die Wechselwirkung zwischen der *hsCK2 α* Δ C und *hsCK2 β* wurde durch isothermale Titrationskalorimetrie untersucht.

Die Abbildung 42 stellt ein typisches Titrationsexperiment dar, das in dem Puffer 25mM Tris/HCl, 1M NaCl pH=8.5 bei 35°C durchgeführt wurde. Bei dieser Bedingung war die Komplexbildung exotherm (negative Peaks in der Abbildung 42) und gesättigt bei einem stöchiometrischen Verhältnis von annähernd 1:1.

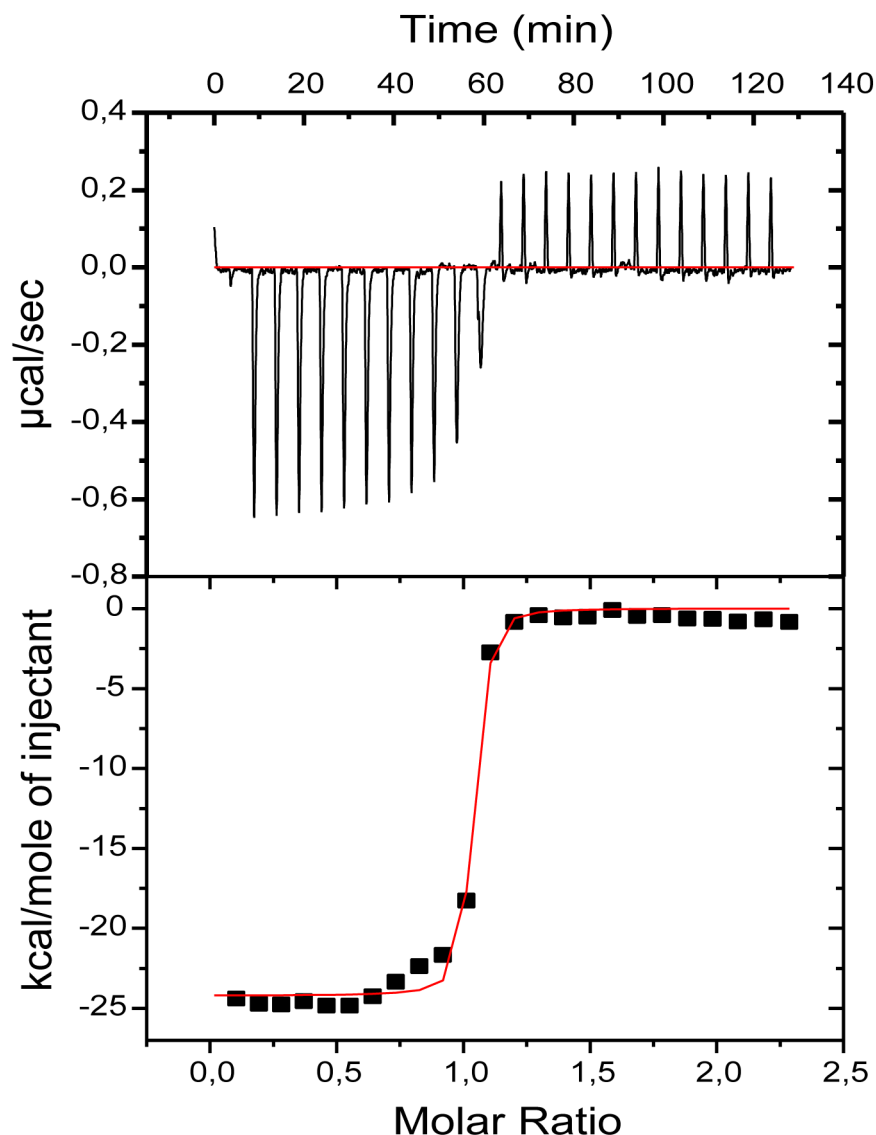


Abbildung 42: ITC-Spektrum der Bindung zwischen der *hsCK2 α* Δ C- und *hsCK2 β* -Untereinheiten.

25 Injektionen der *hsCK2 β* -Lösung wurden zur *hsCK2 α* Δ C-Lösung in der Messzelle zugefügt. Die Fläche unter jedem Injektionspeak entspricht der Wärme, die nach jeder

Injektion freigegeben wurde. Das untere Feld stellt die integrierte Wärme dar, die gegen das molare Verhältnis Ligand : Protein in die Messzelle eingetragen wurde.

Die integrierten Daten ergeben die differentialen thermischen Bindungskurven, die durch die Methode der nicht-linearen Regression analysiert werden können. Man bestimmt dabei die Bindungsstöchiometrie (n), die Bindungskonstante (K_b) und die Bindungsenthalpie (ΔH).

In Anwesenheit von Glycin ist die Bindung endotherm (positive Peaks) und weist die gleiche Stöchiometrie auf (Abbildung 43).

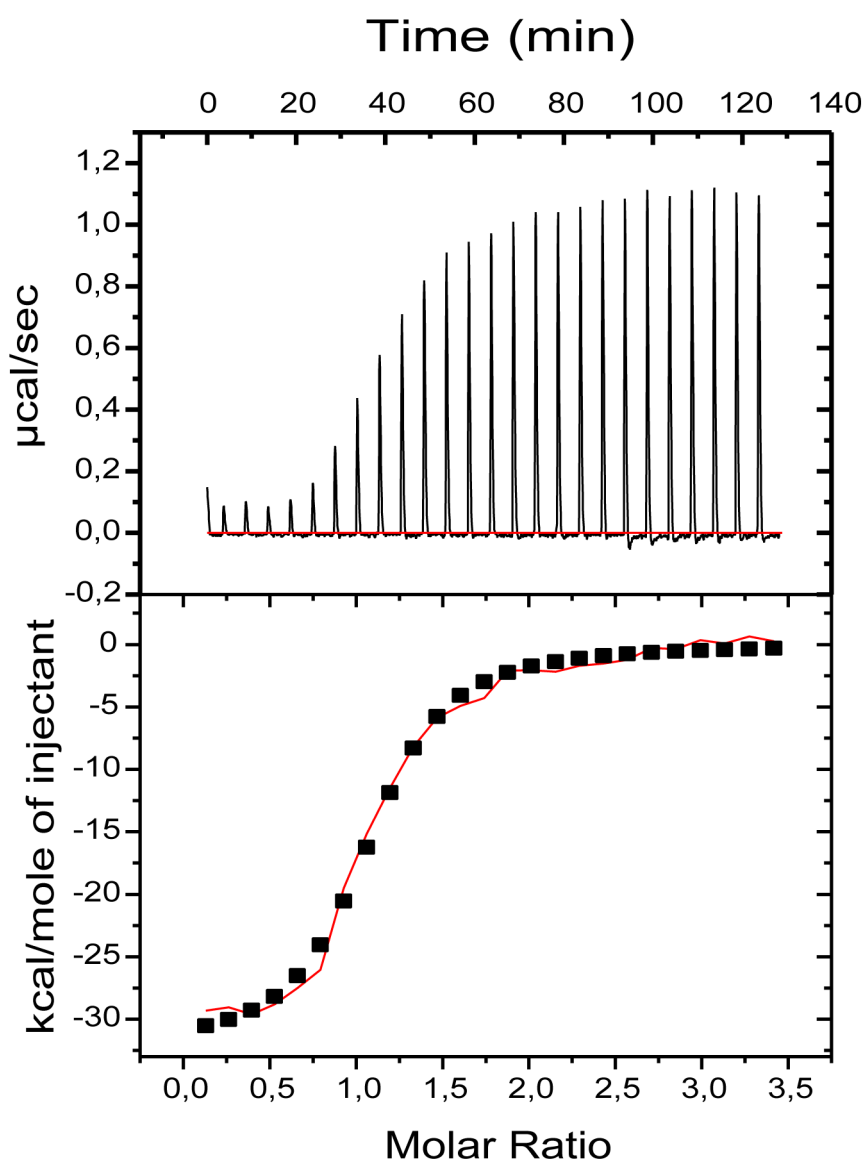


Abbildung 43: Das ITC-Spektrum repräsentiert die Bindung zwischen der *hsCK2 α ΔC*- und *hsCK2 β* -Untereinheiten in der Anwesenheit von 1M Glycin.

Die Ergebnisse der ITC-Messungen sind in Tabelle 24 dargestellt.

Die Bindungskonstante ohne Glycin ist relativ hoch. Für solch eine feste Bindung ($K_a = 10^8 \text{ M}^{-1}$) können nur die Enthalpieänderung und die Stöchiometrie der Assoziation genau bestimmt werden. Für Bindungskonstanten im Bereich von 10^{10} M^{-1} und höher ist die

Differentialrasterkalorimetrie eine besser geeignete Methode (Brandts J. F. & Lin L.-N., 1990).

Tabelle 24: Die Bindungskonstanten zwischen der *hsCK2αΔC*- und *hsCK2β*-Untereinheiten in der Abwesenheit und in der Anwesenheit von 1M Glycin.

Charakteristik	Probe	
	ohne 1M Glycin	mit 1M Glycin
n (Stöchiometrie)	1.0 ± 0.0046	1.05 ± 0.017
K_a (Assoziationskonstante), $[M^{-1}]$	$1.82 \cdot 10^8 \pm 5.7 \cdot 10^7$	$3.78 \cdot 10^6 \pm 5.1 \cdot 10^5$
ΔH (Entalpieänderung), [kcal/mol]	$-2.420 \cdot 10^4 \pm 243$	$3.226 \cdot 10^4 \pm 67.7$

4.7.2 Differentialrasterkalorimetrie

Um die Thermostabilität der Proteinkinase CK2 zu untersuchen, wurde das Holoenzym und seine Untereinheiten mit der Differentialrasterkalorimetrie vermessen.

Die zweite Aufgabe der Messungen war die Abschätzung der Bindungsaffinität zwischen der *hsCK2αΔC*- und *hsCK2β*-Untereinheit nach der „*tight-binding*“ Analyse (Brandt J. F. et al., 1990).

4.7.2.1 Der Einfluß der Salzkonzentration auf die Thermostabilität der *hsCK2α*- und *hsCK2β*-Untereinheiten

Es wurde festgestellt, daß die Erhöhung der Salzkonzentration zu einer größeren Konformationsstabilität der *hsCK2αΔC*-Untereinheit führt. Die Abbildung 44 zeigt, daß der Schmelzpunkt von *hsCK2αΔC* um 6°C wächst, wenn die NaCl-Konzentration von 0.3 auf 1M gesteigert wird (Tabelle 27).

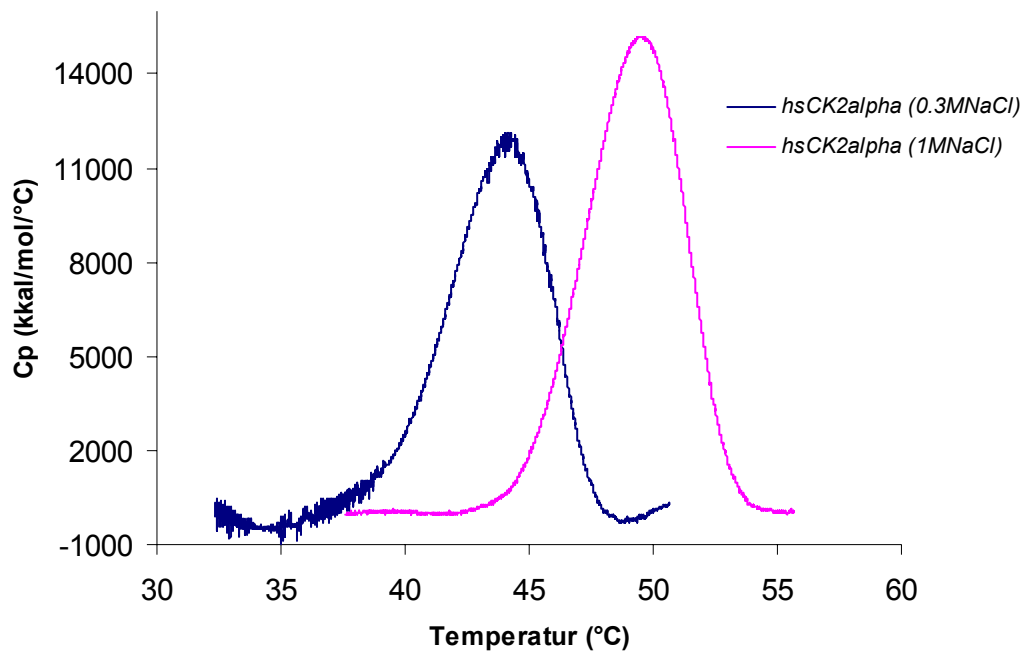


Abbildung 44: Thermostabilität der *hsCK2 α* -Untereinheit bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen

Für die regulatorische *hsCK2 β* -Untereinheit haben die kalorimetrischen Studien generell eine höhere Thermostabilität als für *hsCK2 α* ergeben (Abbildung 45). Die Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer hat in diesem Fall nicht die Proteinthermostabilität beeinflusst. Die T_m für die *hsCK2beta*-Untereinheit lag bei 0.3M und bei 1M NaCl jeweils bei etwa 56°C.

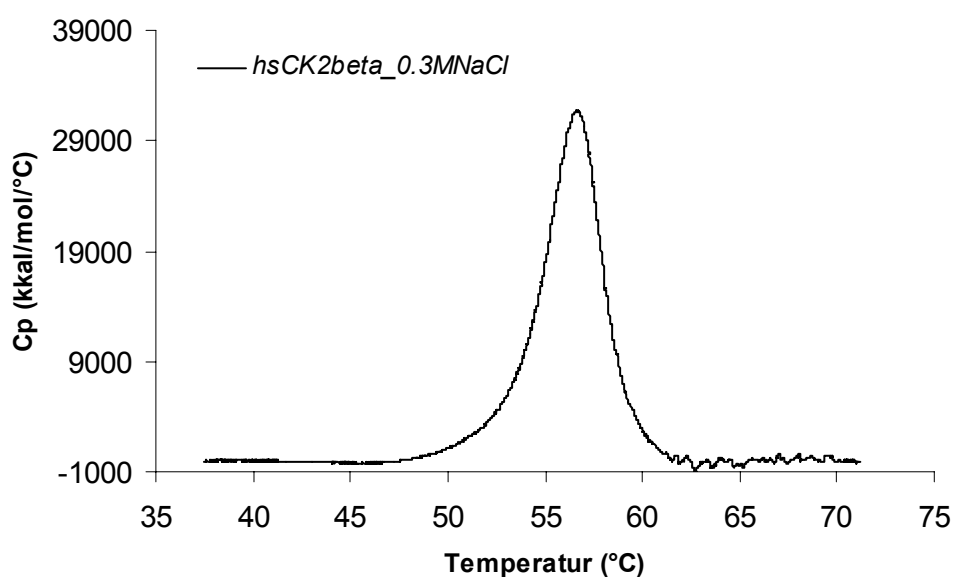


Abbildung 45: DSC-Thermostabilitätskurve der Denaturierung von *hsCK2 β* -Untereinheit.

4.7.2.2 Die Untersuchung der Thermostabilitäten von *hsCK2 α* Δ C und *hsCK2 β* in der Anwesenheit von spezifischen Bindungspartnern

Es ist bekannt, daß die Proteinkinase CK2 und auch ihre katalytische Untereinheit CK2 α durch Heparin gehemmt werden. Heparin hemmt dieses Enzym recht spezifisch und hat im allgemeinen keinen Effekt auf die enzymatischen Aktivitäten anderer Proteinkinasen (Hathaway G.M. et al., 1980). Die Abbildung 46 stellt den stabilisierenden Effekt von Heparin auf *hsCK2 α* Δ C dar.

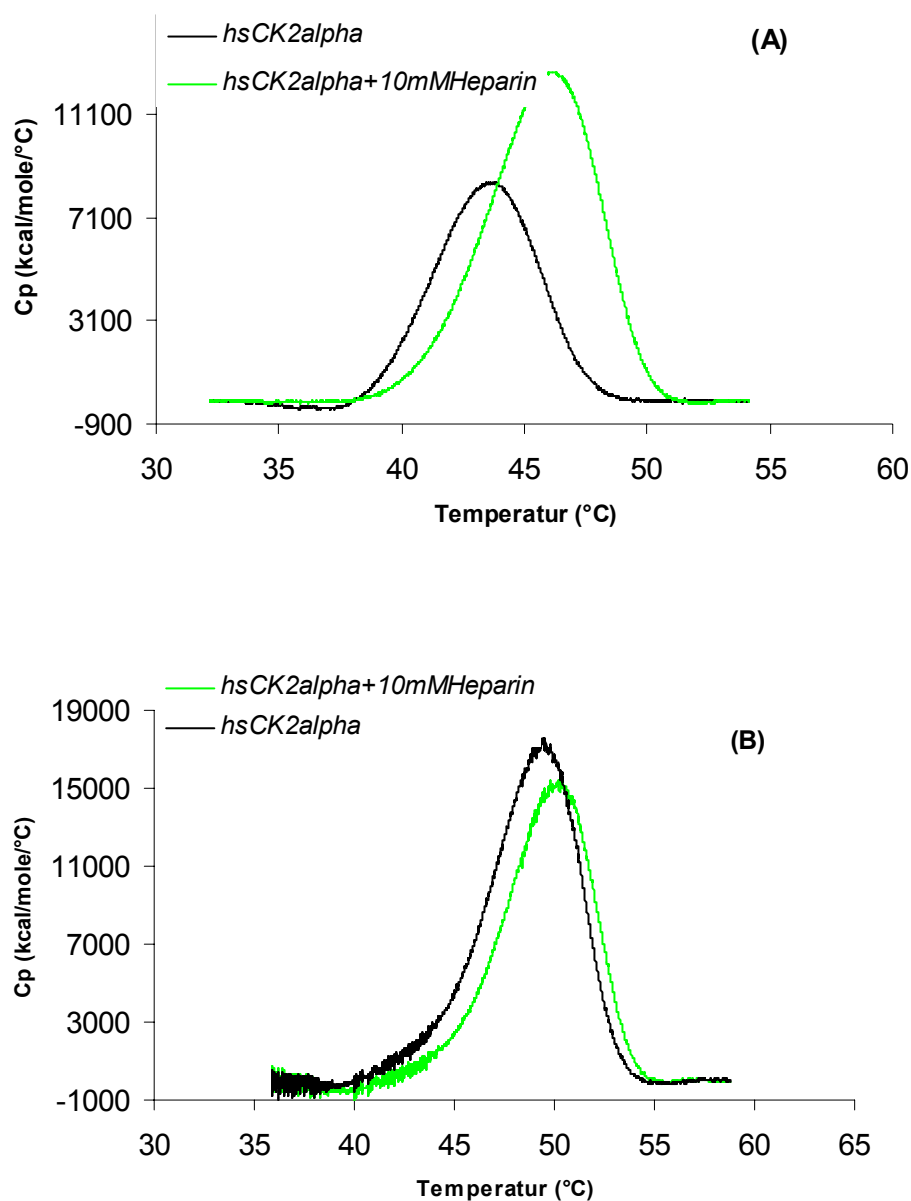


Abbildung 46: Der Einfluß von Heparin auf die *hsCK α* Δ C-Thermostabilität.

Die gleiche thermostabilisierende Wirkung von Heparin wurde sowohl im Puffer mit 0.3M

NaCl-Konzentration (Abbildung 46(A)) als auch mit 1M NaCl-Konzentration (Abbildung 46 (B)) beobachtet. Der T_m -Wert erhöht sich bei der niedrigen Salzkonzentration um 7°C und bei der höheren Salzkonzentration um 3°C.

Polyamine und insbesondere Spermin stimulieren die katalytische Aktivität der Proteinkinase CK2. Diese Stimulation ist abhängig von der Anwesenheit der regulatorischen Untereinheit CK2 β (Leroy D. et al., 1997). Deshalb war es sinnvoll, den Effekt von Spermin auf die regulatorische *hsCK2 β* -Untereinheit alleine und im Komplex mit *hsCK2 $\alpha\Delta C$* zu untersuchen. Es wurde festgestellt, daß *hsCK2 β* nach Zugabe von 6mM Spermin viel stabiler wird. Der T_m -Wert wird von 57°C auf 63°C verschoben (Abbildung 47).

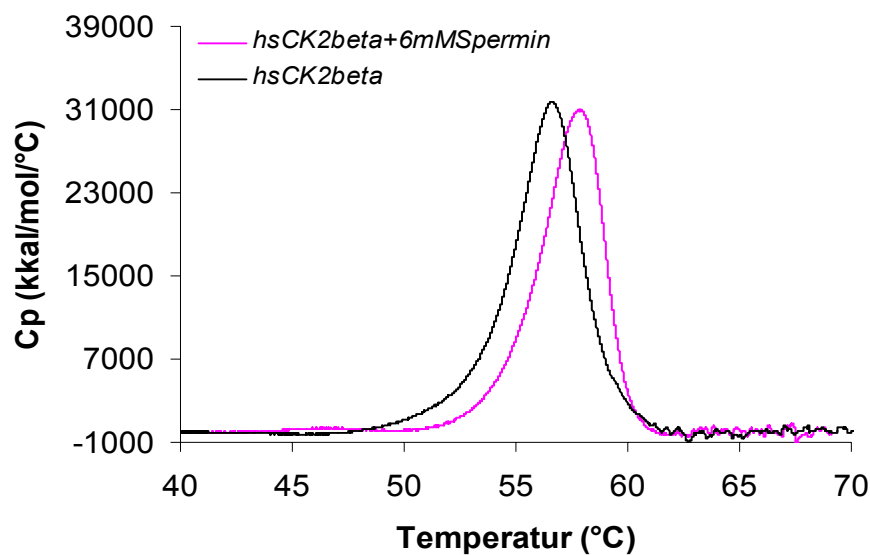


Abbildung 47: Der Einfluß von Spermin auf die *hsCK2 β* -Thermostabilität.

4.7.2.3 Änderung der Thermostabilität der Proteinkinase CK2 in der Anwesenheit von Spermin und Heparin

Die Thermostabilität des CK2-Holoenzymen ist ebenfalls abhängig von der Ionenstärke des Puffers. In Abbildung 48 (A) sind die kalorimetrischen Messungen in Gegenwart von 0.3M NaCl dargestellt. Man sieht, daß die thermodynamische Kurve für CK2 in Abwesenheit eines Liganden zwei Maxima hat, nämlich bei $T_{m1} = 56.5^{\circ}\text{C}$ und $T_{m2} = \text{ca. } 62^{\circ}\text{C}$. Diese beiden Peaks gehören möglicherweise zu unterschiedlichen, oligomeren Zuständen von CK2, was im Diskussionsteil später noch erwähnt wird.

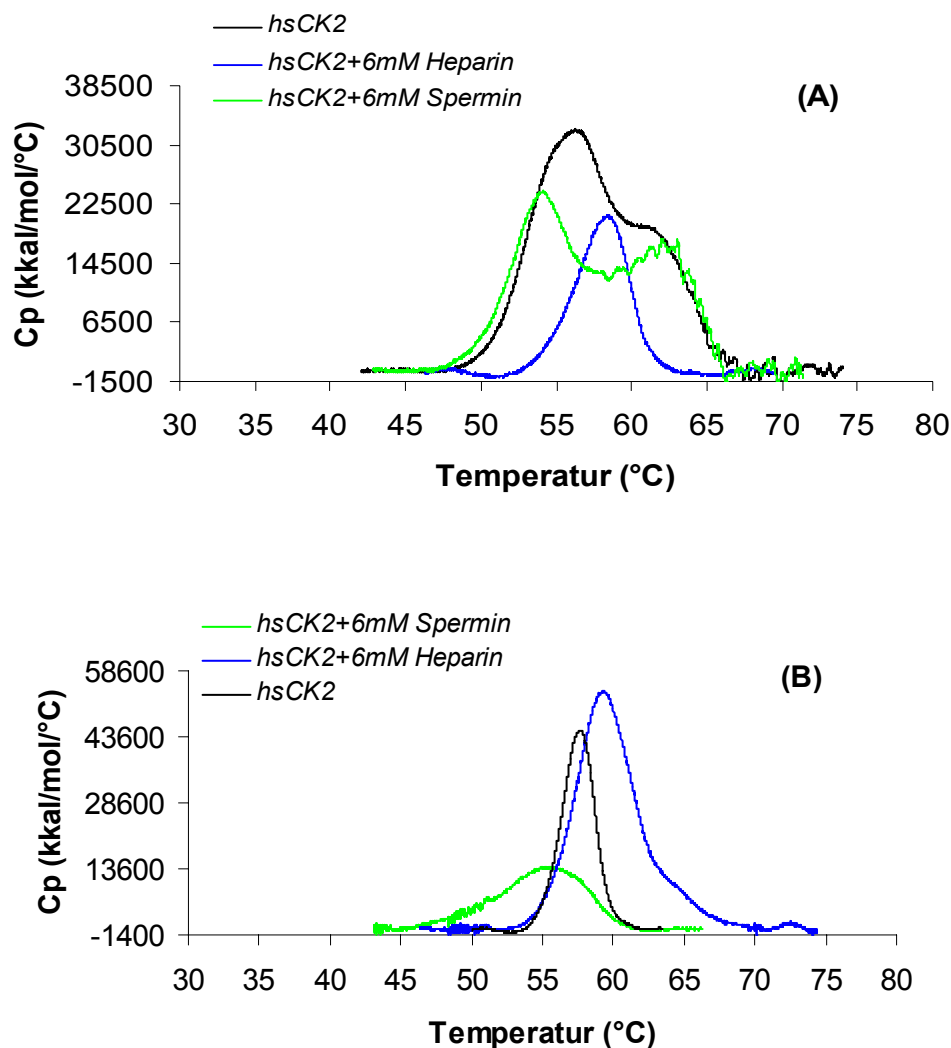


Abbildung 48: Thermostabilität des *hsCK2*-Holoenzymes ohne und in der Anwesenheit von ihrer physiologischen Liganden. (A) - Die Daten sind im 25mM Tris/HCl pH=8.5, 0.3M NaCl gemessen (B) – Die Daten sind im 25mM Tris/HCl pH=8.5, 1M NaCl gemessen.

Nach der Zugabe von 6mM Spermin, das als Aktivator für die enzymatische Aktivität von CK2 gilt, hat sich die Form der Kurve wenig verändert. Der Schmelzpunkt T_{m1} wurde vermindert und entsprach in diesem Fall nur noch 54°C . Die Anwesenheit von Heparin, stabilisiert das Protein, wobei nur ein Schmelzpunkt bei $T_m = 58^{\circ}\text{C}$ beobachtet wurde.

Der Zustand des Proteins ändert sich bei der höheren Ionenstärke des Puffers (Abbildung 48 (B)). Bei einer Salzkonzentration von 1M NaCl wird das Protein viel stabiler ($T_{m1} = 58.61^{\circ}\text{C}$), der zweite Peak T_{m2} , fehlt in diesem Fall. Die Zugabe von 6mM Spermin und von 10mM Heparin wirkt auf CK2 ähnlich wie in Anwesenheit der niedrigeren Salzkonzentration. In Anwesenheit vom Spermin sinkt die Schmelztemperatur des Proteins auf $T_m = 55^{\circ}\text{C}$. Heparin dagegen stabilisiert das Protein und bringt die Schmelztemperatur bis auf $T_m = 61.5^{\circ}\text{C}$.

4.7.2.4 Der Effekt der *hsCK2* β -Bindung auf die Thermostabilität von *hsCK2* $\alpha\Delta\text{C}$

Es war interessant, in diesem Zusammenhang zu untersuchen, wie die Anwesenheit der *hsCK2* β - Untereinheit bei der spontanen Komplexbildung zu *hsCK2* auf die Thermostabilität von *hsCK2* $\alpha\Delta\text{C}$ wirkt. Auch diese Messungen wurden bei zwei unterschiedlichen Salzkonzentrationen durchgeführt. Obendrein wurde das Verhältnis zwischen den *hsCK2* $\alpha\Delta\text{C}$ - und *hsCK2* β - Untereinheiten variiert (Abbildung 49). In beiden Fällen entsprach das Verhältnis 1 : 1 der Bildung des Holoenzym *hsCK2*.

Beim *hsCK2* $\alpha\Delta\text{C}$ -Überschuss bekommt man zwei Peaks: ein Peak entspricht der nicht-gebundenen *hsCK2* $\alpha\Delta\text{C}$ -Untereinheit und der andere dem gebildeten Komplex *hsCK2*. Dabei beobachtet man eine Verschiebung der Schmelztemperatur von *hsCK2* $\alpha\Delta\text{C}$ -Untereinheit durch Bindung von *hsCK2* β um 8°C (Tabelle 27).

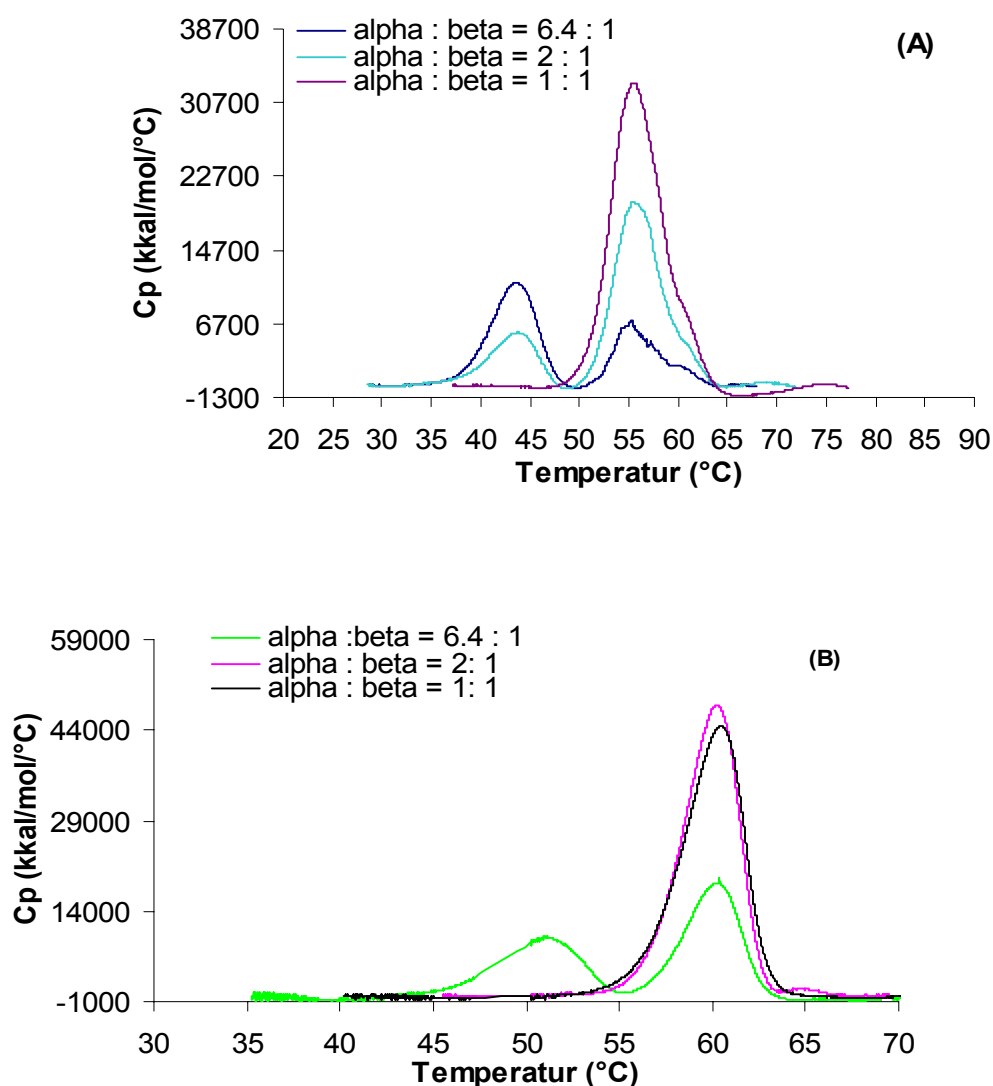


Abbildung 49: Thermostabilität von *hsCK2αΔC* in Anwesenheit von *hsCK2β* bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen. (A) – 0.3M NaCl; (B) – 1.0M NaCl

4.7.2.5 Die Messung der Bindungsaffinität zwischen der *hsCK2αΔC* und *hsCKβ*

Mit ITC können Bindungskonstanten nur bis zu einem Bereich von 10^8 - 10^9M^{-1} bestimmt werden. Um die mit ITC gemessenen Bindungskonstanten zu bestätigen, wurde die Differentialrasterkalorimetrie für die Bestimmung der Bindungskonstanten angewendet. Mit dieser Methode sind grundsätzlich Bindungskonstanten erhältlich, die im Bereich bis 10^9 – 10^{20}M^{-1} liegen. Die erhaltenen K_b -Werte lagen im Bereich bis zu 10^6M^{-1} (Tabelle 25), was für die hohe Bindungsaffinität spricht.

Tabelle 25: Bindungskonstanten K_b zwischen der *hsCK2 α* Δ C- und *hsCK2 β* -Untereinheiten bei der unterschiedlichen Salzkonzentrationen, ermittelt durch DSC. Es wurden jeweils drei parallele Messungen durchgeführt.

<i>hsCK2α</i> Δ C : <i>hsCK2β</i> = 1 : 1	Bindungskonstante K_b [M ⁻¹]
<u>Puffer:</u> 25mMTris/HCl pH=8.5 0.3MNaCl 1. 2. 3.	1.63 *10 ⁷ 2.01*10 ⁷ 1.68*10 ⁷
<u>Puffer:</u> 25mMTrisHCl pH=8.5 1.0MNaCl 1. 2. 3.	2.06*10 ⁷ 1.67*10 ⁷ 2.03*10 ⁷

4.7.2.6 Kalorimetrische Messungen von *hsCK2 α* Δ C / *hsCK2 β* -Wechselwirkungen in Anwesenheit von Glycin

Sowohl durch ITC als auch durch DSC wurde die Bindungsaffinität zwischen *hsCK2 α* Δ C und *hsCK2 β* in Anwesenheit von 1M Glycin bestimmt. In Tabelle 26 sind die Änderungen der Thermostabilitäten aufgeführt, die nicht nur für die einzelnen Untereinheiten, sondern auch für den gebildeten *hsCK2*-Holoenzymkomplex beobachtet wurde.

Tabelle 26: DSC-Messungen, die in der Anwesenheit von 1MGlycin durchgeführt waren. In Klammern stehen die Daten, die bei den gleichen Experimenten ohne Glycin gemessen wurden.

Probe	Temperatur [°C]	Bindungskonstante K_b [M ⁻¹]
<i>hsCK2α</i> Δ C	54.21 (49.44)	-
<i>hsCK2β</i>	61.00 (56.66)	-
<i>hsCK2α</i> Δ C : <i>hsCK2β</i> = 1 : 1	63.32 (59.32)	1.45*10 ⁶ (1.63*10 ⁷)
<i>hsCK2α</i> Δ C : <i>hsCK2β</i> = 3 : 1	54.48 (49.22)	2.13*10 ⁶ (2.31*10 ⁷)

4.7.2.7 Zusammenfassung der DSC- und ITC- Experimente

Während der Durchführung der DSC- und ITC-Experimente wurden folgende Besonderheiten des thermalen Verhaltens des *hsCK2*-Holoenzymes und seiner einzelnen Untereinheiten festgestellt:

- 1) Das Verhalten von *hsCK2 α Δ C* und des *hsCK2*-Holoenzymes sind abhängig von der Ionenstärke des Puffers, *hsCK2 β* dagegen zeigt keine Veränderung in der Thermostabilität bei der Erhöhung der Salzkonzentration. Man sieht auf den *hsCK2*-Thermostabilitätskurven bei niedrigen Salzkonzentrationen zwei Maxima.
- 2) In der Anwesenheit von Spermin sinkt die Schmelztemperatur des Übergangs im Falle von *hsCK2*, die *hsCK2 β* -Untereinheit wird aber wesentlich stabiler.
- 3) Heparin zeigt sich als guter Stabilisator sowohl für *hsCK2 α Δ C* als auch für das *hsCK2*-Holoenzym.
- 4) *hsCK2 β* zeigt einen stabilisierenden Effekt auf *hsCK2 α Δ C* bei der Bildung des *hsCK2*-Holoenzymkomplexes.
- 5) Die Zugabe von 1M Glycin führt zur Erhöhung der Thermostabilität bei allen untersuchten Proteinen.
- 6) Die thermische Denaturierung aller untersuchten Proteine war irreversibel, denn es konnten keine Übergänge beim Wiederheizen festgestellt werden.
- 7) Die mit beiden Methoden gemessenen Bindungskonstanten sind gute Indizes dafür, daß das *hsCK2*-Holoenzym ein transienter und nicht-obligater Protein-Protein-Komplex ist.

Die Tabelle 27 fasst alle gemessenen Temperatur-Werte zusammen.

Tabelle 27: Zusammenfassung der T_m -Werten aus der durchgeführten DSC-Messungen.

Probe	T_{m1}	T_{m2}
<u>Puffer:</u> 25mM Tris/HCl 0.3M NaCl pH=8.5		
<i>hsCK2alphaΔC</i>	43.3	
<i>hsCK2alphaΔC</i> + 10mMHeparin	50.1	
<i>hsCK2beta</i>	56.7	
<i>hsCK2beta</i> + 6mMSpermin	63.1	
		61.8
<i>hsCK2</i>	56.5	-
<i>hsCK2</i> + 10mMHeparin	58.3	61.7
<i>hsCK2</i> + 6mMSpermin	54.3	
		55.8
<i>hsCK2alphaΔC</i> : <i>hsCK2beta</i> = 1 : 1	-	55.9
<i>hsCK2alphaΔC</i> : <i>hsCK2beta</i> = 2 : 1	43.2	55.5
<i>hsCK2alphaΔC</i> : <i>hsCK2beta</i> = 6.4 : 1	43.6	
<u>Puffer:</u> 25mM Tris/HCl 1.0M NaCl pH=8.5		
<i>hsCK2alphaΔC</i>	49.4	
<i>hsCK2alphaΔC</i> + 10mMHeparin	51.9	
<i>hsCK2beta</i>	56.2	
<i>hsCK2beta</i> + 6mMSpermin	63.5	
		59.6
<i>hsCK2</i>	-	61.5
<i>hsCK2</i> + 10mMHeparin	-	-
<i>hsCK2</i> + 6mMSpermin	55.1	
		62.0
<i>hsCK2alphaΔC</i> : <i>hsCK2beta</i> = 1 : 1	-	61.9
<i>hsCK2alphaΔC</i> : <i>hsCK2beta</i> = 2 : 1	-	61.1
<i>hsCK2alphaΔC</i> : <i>hsCK2beta</i> = 6.4 : 1	52.2	

5 Diskussion

5.1 Kristallographische Studien

5.1.1 *hsCK2 $\alpha\Delta$ C*

hsCK2 $\alpha\Delta$ C wurde in der Anwesenheit von AMPPNP, einem ATP-Ersatz, das bei der Kristallisation nicht hydrolysiert wird, und einem *in-vitro*-Peptidsubstrat mit der Aminosäuresequenz RRRADDSDDDDD co-kristallisiert. Es wurden zwei Datensätze gemessen. Die entsprechenden Strukturen wurden dann mit Hilfe der Methode des Molekularen Ersatzes gelöst und bis 2.5 Å und 1.8Å verfeinert. In beiden Fällen ist die Aminosäurekette gut über die ganze Länge definiert (Abbildung 50). Ein gut gebundenes AMPPNP-Molekül konnte nur für den Kristall mit niedrigerer Auflösung beobachtet werden. Deshalb werden in der Diskussion die Ergebnisse aus den beiden Datensätzen herangezogen.

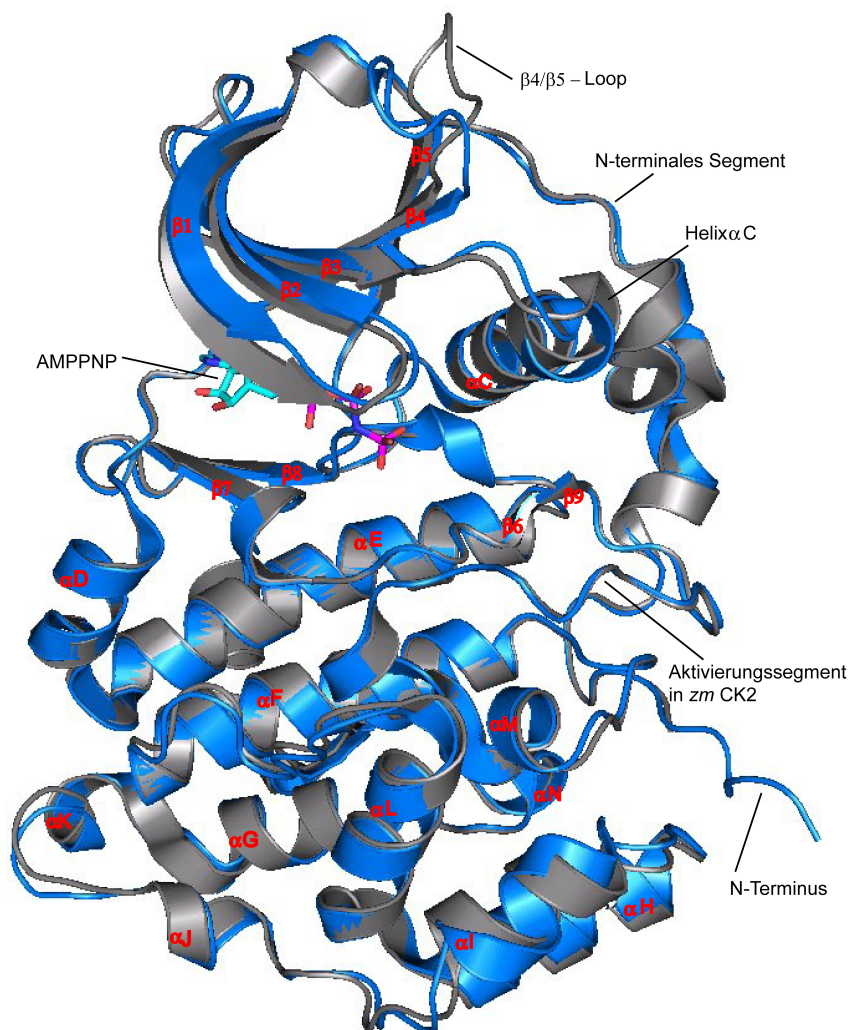


Abbildung 50: Die Faltung des *hsCK2 α* -Monomers. β4/β5-Loop im Vergleich mit gefundenen im *zmCK2 α* (PDB file 1LP4). Blau – *hsCK2 α* ; grau – *zmCK2 α* .

5.1.1.1 Co-Substrat-Bindungsstelle

Im Fall des Datensatzes bis 2.5Å kann man deutlich das ATP-Analogon AMPPNP an der Co-Substratbindungsstelle beobachten (Abbildung 51). Die Dichte-Qualität in dieser Region ist reduziert, was auch den relativ hohen B-Faktoren der AMPPNP-Atome entspricht. Ein Vergleich mit einem homologen Protein, dem ternären Komplex der cAMP-abhängigen Proteinkinase (CAPK) zeigt, daß die Position der γ -Phosphatgruppe nicht ganz korrekt für die Phosphatrest-Übertragung liegt. Dieser Befund paßt dazu, daß in der Struktur Mg^{2+} -Ionen fehlen, die normalerweise für die Phosphorylierungsreaktion nötig sind.

Das für die Co-Kristallisation verwendete Peptidsubstrat wurde auch nicht in dem erwartenden Bereich gefunden.

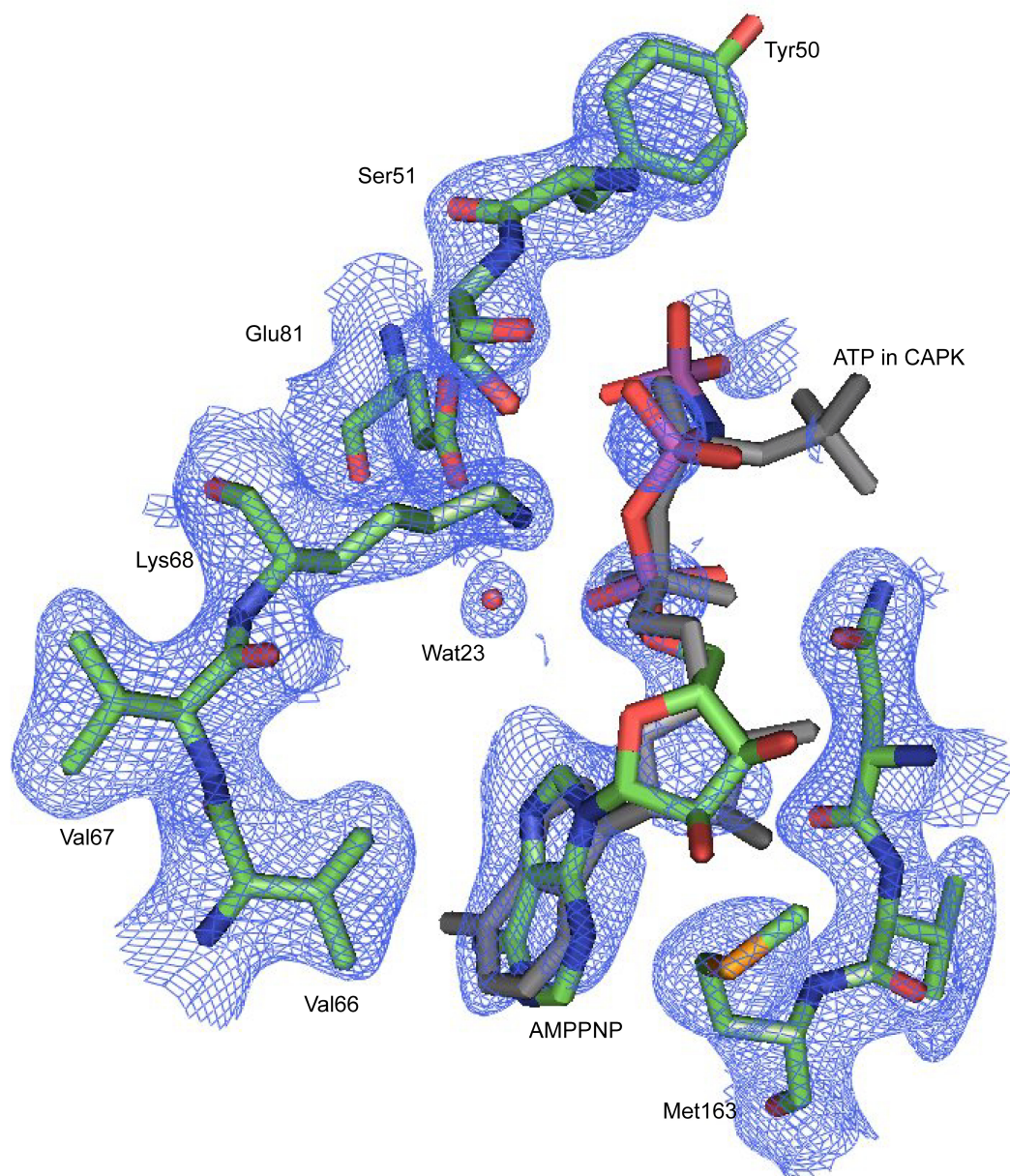


Abbildung 51: Co-Substrat-Bindungsstelle. Grau – ATP im CAPK/ATP-Komplex

5.1.1.2 Beobachtungen der Kristallpackung

Die Größe der asymmetrischen Einheit und die Abwesenheit einer zweizähligen oder höheren Drehachse in der Kristallsymmetrie sprechen dafür, daß *hsCK2 $\alpha\Delta$ C* als ein Monomer kristallisiert wurde. Dies stimmt mit den anderen Befunden überein. So wurde festgestellt, daß CK2 α nur als Monomer sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vorkommt (Valero E., 1997; Valero E., 2003). Sogar im CK2-Holoenzym wechselwirken die CK2 α -Untereinheiten nicht miteinander (Abbildung 52). Man beobachtet in der CK2-Holoenzym-Struktur, daß die beiden CK2 α -Ketten weit weg voneinander liegen (ca. 30Å) und daß die CK2 β -Untereinheit die entscheidende Rolle bei der Bildung des Holoenzym spielt (Niefind K., et al., 2001).

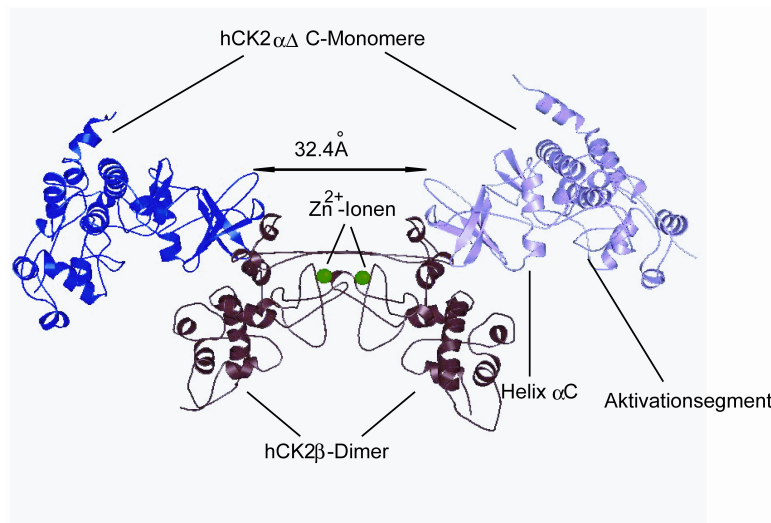


Abbildung 52: *hsCK2*-Holoenzym (Niefind K. et al., 2001; PDB file 1JWH). Vor der Bildung des Holoenzym-Komplexes wird ein CK2 β -Dimer gebildet, das als Anker für die Bindung der CK2 α -Monomeren im Holoenzym dient.

Die *hsCK2 $\alpha\Delta$ C*-Struktur ist ein weiterer Beweis dafür, daß CK2 α -Protomere keine stabilen Wechselwirkungen miteinander eingehen. Dieser Befund war durch ein halb-theoretisches Modell des CK2-Holoenzymes (Battistutta R. et al., 2000) infrage gestellt worden.

5.1.1.3 Aktive Konformation der isolierten katalytischen Untereinheit *hsCK2 $\alpha\Delta$ C*

Bei einem Vergleich zwischen *zmCK2 α* , *hsCK2 $\alpha\Delta$ C* sowie den *hsCK2 α* -Untereinheiten aus dem Holoenzym sind strukturelle Abweichungen, aber auch Gemeinsamkeiten offensichtlich. Man sieht, daß *hsCK2 $\alpha\Delta$ C* in einer aktiven Konformation vorliegt (Abbildung 50; Abbildung 53E). Das betrifft insbesondere das Aktivierungssegment und die Helix α C, die als die wichtigsten Elemente der konformationellen Plastizität und der Regulation bei eukaryotischen Proteinkinasen gelten (Huse M. & Kuriyan J., 2002).

Nur in der aktivierten Konformation der Helix α C ist die Bildung einer Salzbrücke zwischen Glu81 und Lys68 möglich (Abbildung 52). Durch diese Salzbrücke wird Lys68 fixiert und

kann so an die α - und die β -Phosphatgruppe von ATP binden. Im Vergleich mit anderen Kinasen, deren Kristallstrukturen schon bekannt sind, wurde CK2 α sowohl im isolierten Zustand als auch im Holoenzym nur in der aktiven Konformation gefunden. Gewöhnlich schaltet eine Proteinkinase zwischen einem aktiven und verschiedenen inaktiven Zuständen um. Um Proteinkinasen aus den inaktiven in den aktiven Zustand zu bringen, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. So kann dieser Übergang durch die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung oder durch die Bindung bzw. die Freisetzung von Kontrollproteinen realisiert werden. Die Cyclin-abhängige Kinase CDK 2 ist ein sehr anschauliches Beispiel für derartige Aktivierungsmechanismen. Außerdem ist die CDK2 eine der nächsten Verwandten von CK2 α und ist somit bei der Erklärung der aktiven Konformation von *hsCK2 α Δ C* sehr nützlich.

Die CDK2 wurde in drei unterschiedlichen Konformationen kristallisiert und strukturell charakterisiert (De Bondt H. L. et al, 1993; Jeffrey P. H. et al, 1995; A. A. Russo A. A. et al, 1996). In der Abbildung 53 A, B, C ist der Vergleich der Aktivierungsschleife in unterschiedlichen Zuständen dargestellt. Die sogenannte „Grobregulation“ passiert durch die Bindung von Cyclin A, die CDK 2 in einen partiell aktiven Zustand bringt. Dieser Übergang ist mit wesentlichen Konformationsänderungen verbunden. Die anschließende „Feinregulation“ besteht aus einer Phosphorylierung an Thr 160, die zu kleineren Konformationsänderungen führt.

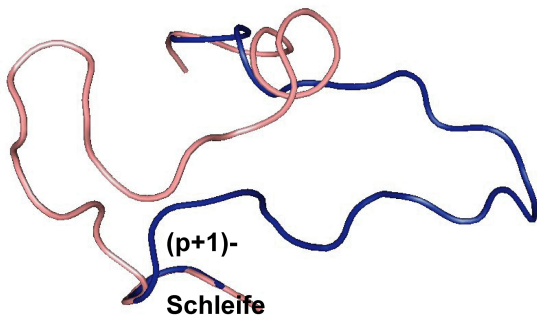
Im Gegensatz dazu stabilisiert CK2 α ihren aktiven Zustand selbst durch die Wechselwirkung zwischen N-terminalem Segment einerseits und Aktivierungsschleife und Helix α C andererseits. Diesen Kontakt wurde bei der allen bekannten Strukturen von CK2 α gefunden. Besonders gut ausgeprägt ist diese Wechselwirkung in der Struktur von *hsCK2 α Δ C*, die in dieser Arbeit dargestellt wird. Die Anwesenheit von CK2 β im Holoenzym macht keinen Einfluß auf die Konformationen jener Schaltelemente: Aktivierungsschleife, Helix α C und N-terminale Region. Diese intramolekulare Wechselwirkung kann als die mögliche passende Erklärung für die konstitutive Aktivität von CK2 α gelten (Niefind K. et al, 1998).

Um die volle Aktivität zu erreichen, benötigen Proteinkinasen eine negative Ladung im Bereich der Aktivierungsschleife, gewöhnlich ist es eine Phospho- oder eine Carboxylgruppe. In Abbildung 53C beobachtet man im Falle der CDK2 die aktivierende Wirkung der Phosphorylierung von Thr160. Sie führt zu einer Konformationsänderung in der Aktivierungsschleife, die anschließend optimal für die Bindung eines Substratproteins oder – peptides vorbereitet ist. Das beweist auch die gelöste Struktur des Komplexes von CDK2, Cyclin A, AMPPNP und einem Peptidsubstrat (Brown N. R. et al, 1999).

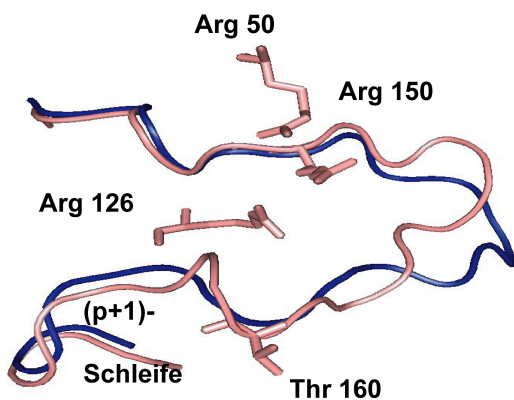
Bei CK2 α liegt die Aktivierungsschleife auch ohne Phosphorylierung in der aktiven Konformation vor. CK2 α ist aber nicht das einzelne Beispiel dafür. Die Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) benötigt genauso wie CK2 keine Phosphorylierung, um aktiv zu sein (Abbildung 53 D). Die negative Ladung in der Anionbindungstasche gibt es aber trotzdem. Es kommt durch die Anwesenheit von einem Anion aus der Kristallisationslösung. Es sind

drei GSK3-Kristallstrukturen bekannt, wo die Anwesenheit von einem Anion festgestellt wurde (D. R. Knighton et al, 1991; M. Ho et al, 1988; R. Dajani et al, 1996). In der Abbildung 53 D befindet sich an der Stelle von diesem Anion ein gebundenes Sulfation.

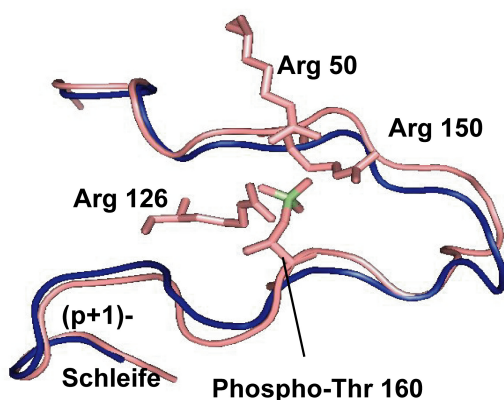
A: **CDK2 (1HCK)**



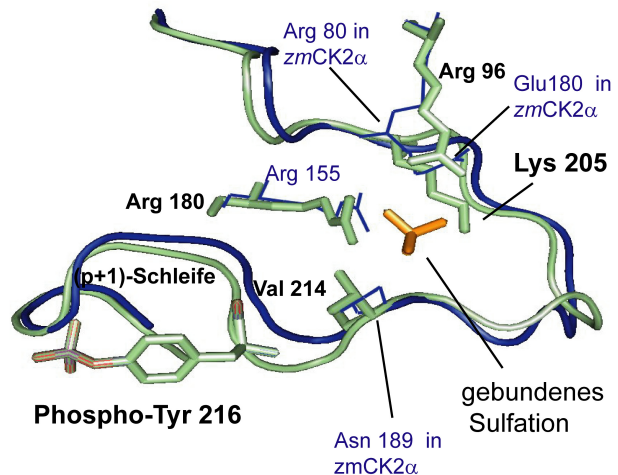
B: **CDK2 (1FIN)**



C: **CDK2 (1JST)**



D: **GSK3 (1GNG)**



E: **hsCK2αΔC**

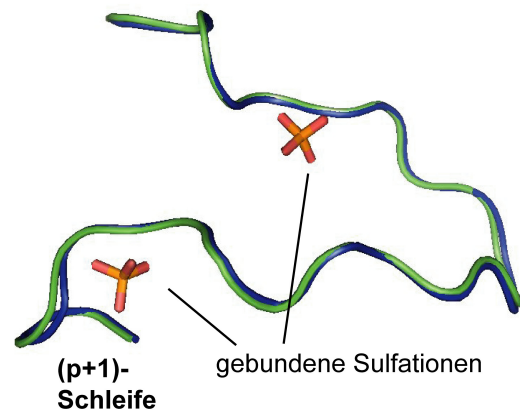


Abbildung 53: Vergleich der Aktivierungsschleifen verschiedener Proteinkinasen mit *zmCK2α*. Blau – in aller Abbildungen die Hauptkette von *zmCK2α*.

Die aktivierende Wirkung von diesem Anion ist aber nicht streng bewiesen. Denn es gibt noch eine Struktur von GSK3 (Betrand J. A. et al, 2003; Aoki M. et al, 2003), wo kein gebundenes Anion gefunden wurde. Die Aktivierungsschleife war in aktiver Konformation, das Protein war jedoch nicht aktiv, was an seiner Kristallisation in der Form eines Dimers lag.

Diese Dimerisierung führte nicht nur zur Stabilisierung des Dimers, sondern auch zur Blockierung des aktiven Zentrums. Erst die Phosphorylierung von Tyr216 ermöglichte die Kristallisation von GSK 3 in der Form eines Monomers (Bax B. et al, 2001). Nach Dajani R., et al, (2001) dient die Anionbindungsstelle im Falle von GSK3 nicht als regulatorisches Zentrum, sondern ist ein Grund für die ungewöhnliche Substratspezifität dieses Enzyms. GSK3 wechselwirkt nämlich mit Substraten, die bereits phosphorylierte Aminosäuren in der (p+4)-Position besitzen.

5.1.1.4 Substratspezifität und Bindung von Anionen an die Substratbindungsebene

Im Gegensatz zu anderen homologen Proteinkinasen wurden bis zu dieser Arbeit in keiner der bekannten Kristallstrukturen von CK2 α gebundene Anionen nahe der Aktivierungsschleife festgestellt. Dabei befand sich, wie es schon oben erwähnt wurde, die Aktivierungsschleife sowohl im isolierten Protein CK2 α als auch im Komplex mit CK2 β als CK2-Holoenzym in der aktiven Konformation. Bei einem Vergleich von CK2 mit GSK3 oder CDK2 kann man feststellen, daß im Fall von CK2 α die positive Ladung, die für die Anionenbindung benötigt wird, abgeschwächt ist. Und zwar besitzt CK2 α , wie es sehr gut in der Abbildung 53 D zu erkennen ist, anstelle der Aminosäure Lys 205 in GSK3 (oder Arg 150 in CDK2) die Aminosäure Glu 180, die in allen bekannten Aminosäuresequenzen von CK2 α vorkommt. Trotz dieses Wechsels ist die Anionenbindung an die Aktivierungsschleife von CK2 α nicht vollkommen ausgeschlossen, wie in dieser Arbeit vorgestellte Kristallstruktur von *hsCK2 α Δ C* bewiesen hat. Bei beiden Kristallstrukturen von *hsCK2 α Δ C* wurde ein Elektronendichtemaxima nahe Arg155 und Arg 80 festgestellt, was in der ersten Struktur (bei 2.5Å Auflösung) (PDB-Code 1PJK) als Chloridion interpretiert wurde. Bei der Vermessung der *hsCK2 α* -Kristalle bei 100K ist es gelungen, eine höhere Auflösung (1.8 Å) zu erreichen und eine besser definierte Elektronendichte zu bekommen. Es wurde eine noch deutlichere Elektronendichte nahe Arg 80 und Arg 155 festgestellt. Obendrein zeichnete sich ein ähnlich geformtes, deutliches Elektronendichtemaximum nahe der (p+1)-Schleife ab. Beide Elektronendichtebereiche wurden mit Sulfationen gefüllt (Abbildung 54), denn die Kristallisationslösung hatte 0.2M (NH₄)₂SO₄. enthalten. Die beiden leeren Elektronendichtebereiche wurden mit den Sulfationen gefüllt (Abbildung 54). Das erste Sulfation befand sich exakt an der Stelle, wo es aus dem Vergleich mit den anderen CMGC-Kinasen erwartet wurde, nämlich gebunden an Arg 155 und an Arg 80. Allerdings ist hier eine leichte Verschiebung zu beobachten, die von dem oben schon erwähnten Austausch von Lys 205 (im GSK3) gegen Glu 180 (im CK2 α) herrührt (Abbildung 53 D). Durch die Anwesenheit der Aminosäure Glu 180 verändern sich in diesem Bereich auch benachbarte Aminosäuren ihre Seitenkettenkonformationen. Die Aminosäuren Arg 80 (Arg 96 in CSK3

und Arg 50 in CDK2) und Arg 155 (Arg 180 in GSK3 und Arg 126 in CDK2) werden leicht von

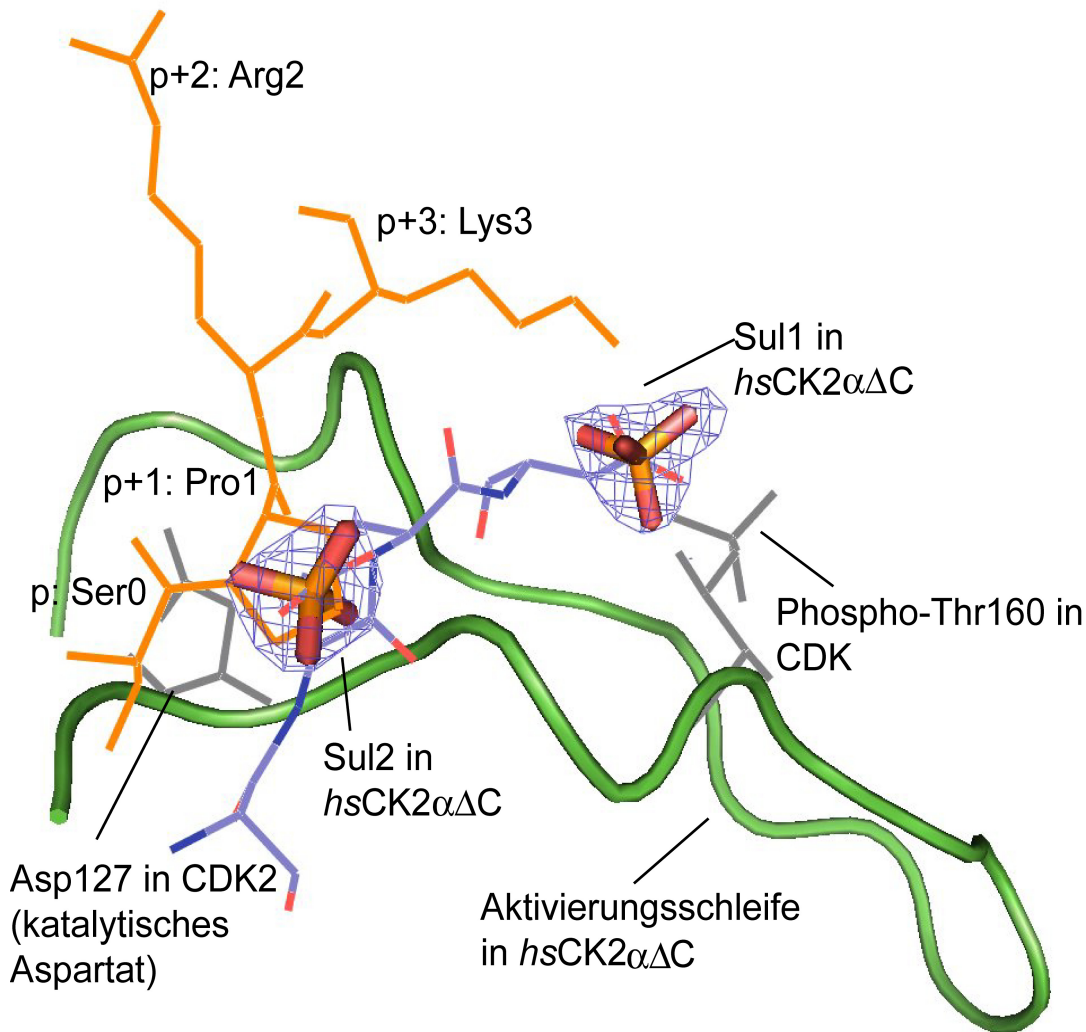


Abbildung 54: Substratbindungsstelle in *hsCK2αΔC*. Modellierung der Bindung des Peptid-Substrates auf der Basis der bekannten Struktur des ternären Komplexes von CDK2. Violett – im CDK2-Komplex gebundenes Substratpeptid; rosa - das modellierte CK2-Substratpeptid.

der üblichen Anionenbindungsstelle weggeneigt. Die Abbildung 54 zeigt diese Verschiebung gegenüber Phospho-Thr 160 in CDK2. Sowohl die Anionenbindung als auch Konformationsänderungen passen zu dem acidophilen Substratprofil der CK2α. Nach dem Überlagern der bekannten Struktur eines Komplexes der Phospho-CDK2 mit einem Cyclin A-Fragment, AMPPNP und einem Substratpeptid (PDB-Code 1QMZ) zeigt sich, daß sich die (p+1)-Seitenkette und die (p+3)-Seitenkette des CDK2-Substratpeptides genau an den Positionen der beiden gebundenen Sulfationen befinden. Es wurde dann auf der Basis dieses Peptides ein CK2α-Peptid mit der Sequenz Asp-Asp-Ser-Asp-Asp-Asp modelliert und anschließend im Komplex mit *hsCK2αΔC* verfeinert. Nach der Verfeinerung stammten die Carboxylgruppen an der (p+3)- und an der (p+1)-Position mit den beiden Sulfationen (Sul1 und Sul2) überein. Der resultierende halb-experimentelle, halb-theoretische ternäre Komplex liefert die zur Zeit zuverlässigen Informationen über die strukturelle Basis der Substraterkennung durch CK2α. Zusammengefasst ergibt sich, dass bei CK2α die beiden

aus anderen Proteinkinasen bekannten Anionenbindungsstellen nicht wie dort zur Regulation, sondern zur Substraterkennung benutzt werden. Ein zentrales Ziel dieser Arbeit, nämlich die Substraterkennung durch CK2 α strukturell zu erklären, wurde damit erreicht.

5.1.1.6 Konformationsänderung der β 4/ β 5-Schleife

Ein weiterer interessanter Befund in der Kristallstruktur von *hsCK2 α Δ C* wurde an der Stelle der β 4/ β 5-Schleife beobachtet. In Zusammenfassung mit der Co-Substrat-Bindung oder der Substraterkennung spielt er keine Rolle, wohl aber für die Architektur des CK2-Holoenzym. Bei dem Vergleich zwischen der *zmCK2 α* , *hsCK2 α* und auch beiden Untereinheiten *hsCK2 α* -Untereinheiten des Holoenzym wurde eine sehr deutliche Umfaltung der β 4/ β 5-Schleife festgestellt (Abbildung 55). Man sieht die Schleife im Falle des Holoenzym in einem „offenen“ Zustand. In der isolierten *hsCK2 α Δ C* befindet sich diese Schleife in einem „geschlossenen“ Zustand. Die β 4/ β 5-Schleife befindet sich in einer Region, die im CK2-Holoenzym zu der Kontaktfläche zwischen der α - und β -Untereinheiten gehört (Niefind K. et al, 2001) und die strukturell sehr hoch zwischen den eukaryotischen Proteinkinasen konserviert ist (Anhang 1).

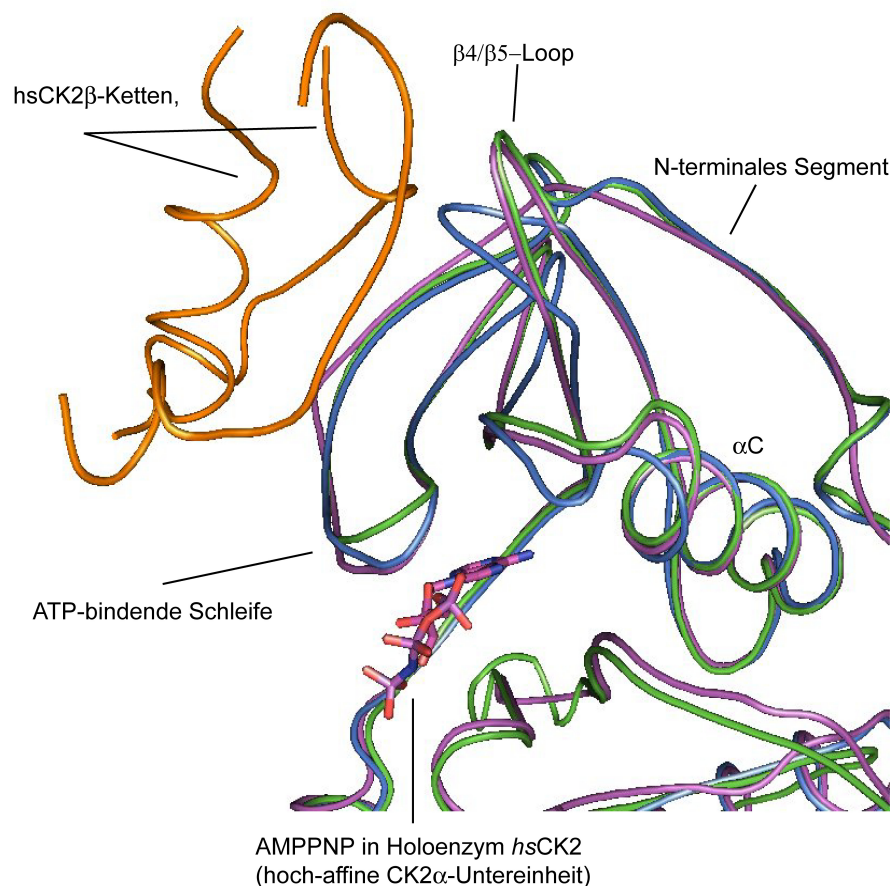


Abbildung 55: Vergleich der Konformationen der β 4/ β 5-Schleife der isolierten CK2 α und CK2 α aus Holoenzym. Blau – *hsCK2 α Δ C*, grün – *hsCK2 α* (hochaffine Kette) im Holoenzym; lila – *hsCK2 α* (niedrigaffine Kette) im Holoenzym; orange – *hsCK2 β* - Kette, die mit der hochaffinen CK2 α im Holoenzym gebunden ist.

Auf der Abbildung 56 ist eine modellierte Struktur von der isolierten *hsCK2 $\alpha\Delta$ C*, die ins *hsCK2*-Holoenzym integriert ist, dargestellt. Nach der neusten Klassifikation der Protein-Protein-Komplexe werden transiente Komplexe nicht nur durch ihre relativ niedrigen Dissoziationskonstanten charakterisiert, sondern auch durch starke Konformationsänderungen bei der Komplexbindung (Nooren I. M. A. & Thornton J. M., 2003). Abbildung 57 zeigt, daß die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife im „geschlossenen“ Zustand zu sterischen Konflikten mit dem *hsCK2 β* -Dimer führt. Die „geschlossene“ Konformation der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife schützt die freie *CK2 α* von der Assoziation mit *hsCK2 β* . Muß man allerdings bemerken, daß die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife im Bereich von Kristallkontakten der *hsCK2 $\alpha\Delta$ C*-Kristalle liegt.

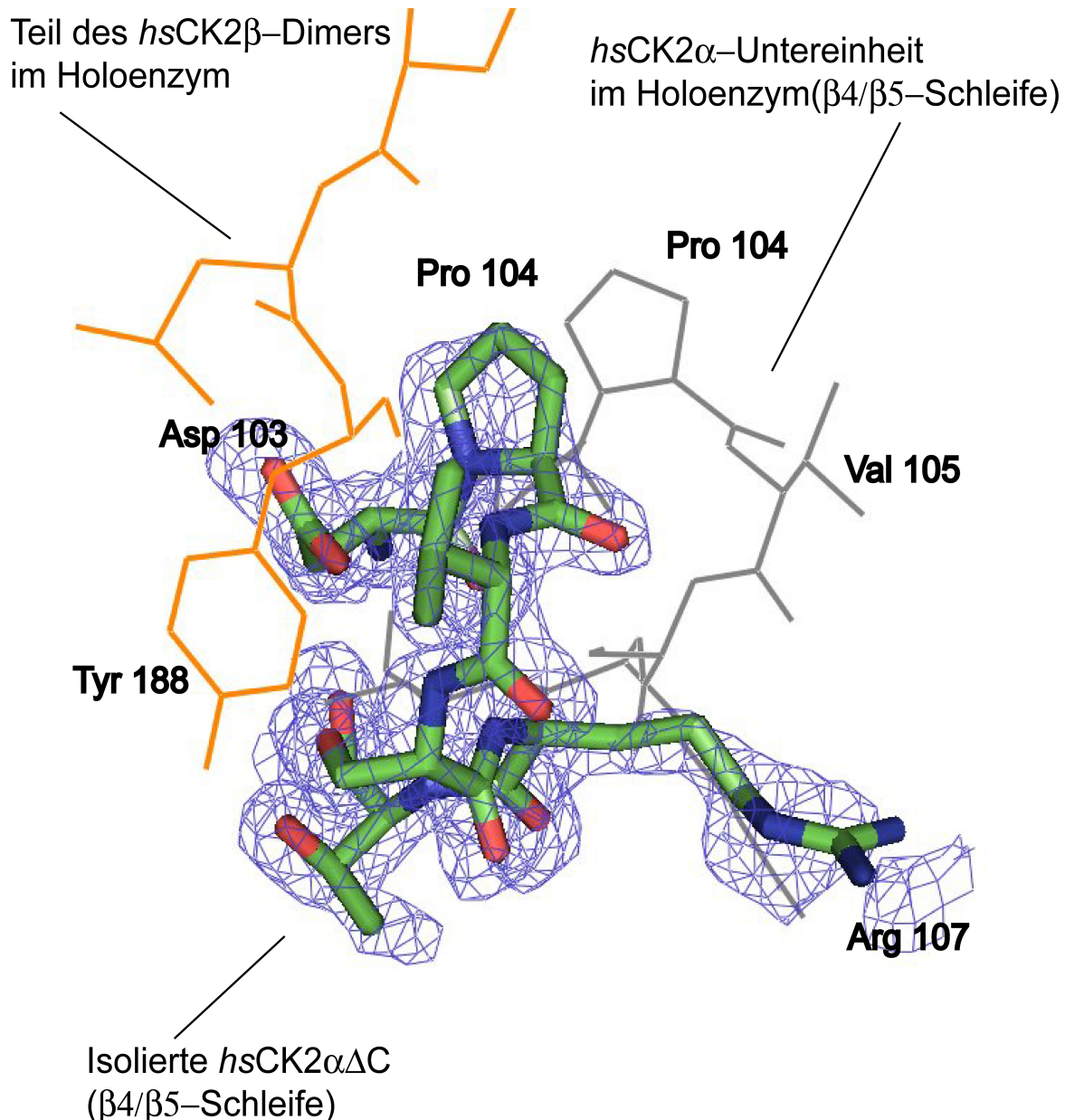


Abbildung 56: Die modellierte Darstellung der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife der isolierten *hsCK2 $\alpha\Delta$ C* in der Anwesenheit von *hsCK2 β* -Untereinheit. Die *hsCK2 α* -Untereinheit aus dem Holoenzym ist schwarz, ein Teil des *hsCK2 β* -Dimers ist orange und die isolierte *CK2 $\alpha\Delta$ C* ist bunt dargestellt. Die Abbildung demonstriert die Unmöglichkeit der Wechselwirkungen zwischen der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife im „geschlossenen“ Zustand und dem *hsCK2 β* -Dimer.

Ein Indiz, daß es sich um eine biologisch sinnvolle Konformation und nicht eine Folge der Kristallpackung handelt, ist die zweite Struktur von *hsCK2 α Δ C*. (Diese Struktur wird in dieser Arbeit auf Grund schlechterer Auflösung und keiner zusätzlicher Information über Co-substrat- oder Substrat-Bindung nicht präsentiert). Die Kristalle sind praktisch bei den identischen Kristallisationsbedingungen gewachsen, gehörten aber zu einer anderen Raumgruppe $P4_3$. Auch hier befindet sich die $\beta 4/\beta 5$ -Schleife in dem geschlossenen Zustand, der mit der Bindung von CK2 β nicht kompatibel ist. In diesem Fall wurde sie nicht in einen Kristallkontaktbereich einbezogen. Die gleiche Konformation der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife wurde schließlich auch im Falle der Mutante *hsCK2 α Δ CV166A/M63L*, deren Struktur auch in dieser Arbeit dargestellt ist, festgestellt. Wiederum liegt die Schleife in der geschlossenen Konformation und sie befindet sich in diesem Fall wieder in dem Bereich der kristallinen Kontakte. Die Kristalle dieser Mutante sind bei anderen Kristallisationsbedingungen gewachsen und weisen eine ganz andere Symmetrie und andere Packung auf. Das Auftreten der gleichen Konformation in verschiedenen Kristallpackungen spricht dafür, daß diese Konformation spezifisch für CK2 α in dem isolierten Zustand ist und die Bindung von CK2 β nur bei der Umfaltung der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife möglich ist. Die Möglichkeit, zwischen einer „offenen“ und einer „geschlossenen“ Konformation zu wählen, kann eine gute Erklärung sein, warum *in vivo* nicht alle CK2 α -Monomeren in CK2-Holoenzym-Komplexe integriert werden. Es ist nachgewiesen worden, daß sowohl CK2 α -Monomere als auch CK2 β -Dimere unabhängig voneinander und von dem CK2-Holoenzym *in vivo* auftreten können (Faust M., et al., 2000; Martel V., et al, 2002). Beiden Proteine reagieren nicht nur miteinander, sondern haben auch andere Wechselwirkungspartner und spezifische Funktionen in der Zelle (Boldyreff B. & Issinger O.-G., 1997; Jensen H.H., 2001). Diese lange Zeit strittigen Befunde haben durch die in dieser Arbeit entdeckte holoenzym-inkompatible Konformation von CK2 α ein zusätzliches Gewicht bekommen.

5.1.2 *hsCK2αΔC-V166A/M63L*

5.1.2.1 Die strukturellen Voraussetzungen für die Herstellung der *hsCK2αΔC-V166A/M63L*-Mutante

5.1.2.1.1 Die Ribose-Anker-Stelle

Der Vergleich der Kristallstrukturen der binären Komplexe von *zmCK2α*/AMPPNP, *zmCK2α*/GMPPNP und cAMP-abhängige Proteinkinase (CAPK)/ATP zeigte einige wesentliche Besonderheiten der Nukleotid-Bindung bei diesen Proteinkinasen (Niefind K. et al, 1998; Niefind K. et al, 1999; Zheng J, 1993). Man sieht, daß sich die größten Unterschiede in der Nukleotidbindung in der Adenin-Base-Ebene und in dem Ribosering-Bereich zeigen. In der Struktur von CAPK wird das ATP-Molekül durch die Wasserstoffbrücke an die negative Seitenkette Glu127 fixiert, was nicht der Fall für die *zmCK2α* ist. Bei *zmCK2α* befindet sich die äquivalente Aminosäure Asp120 wesentlich weit von dem Ribosering entfernt (Abbildung 57). Man spricht im Fall von *zmCK2α* über die Abwesenheit von dem sogenannten Riboseanker. Deshalb erweist das AMPPNP-Molekül die gewisse Freiheit in der Bewegung von Adeninringebene. Diese strukturelle Besonderheit von *zmCK2α* erschafft die Möglichkeit für die GTP-Molekül-Bindung, was theoretisch, in dem Zusammenhang mit dem GTP-Molekül-Aufbau, die große strukturelle Einschränkungen haben sollte.

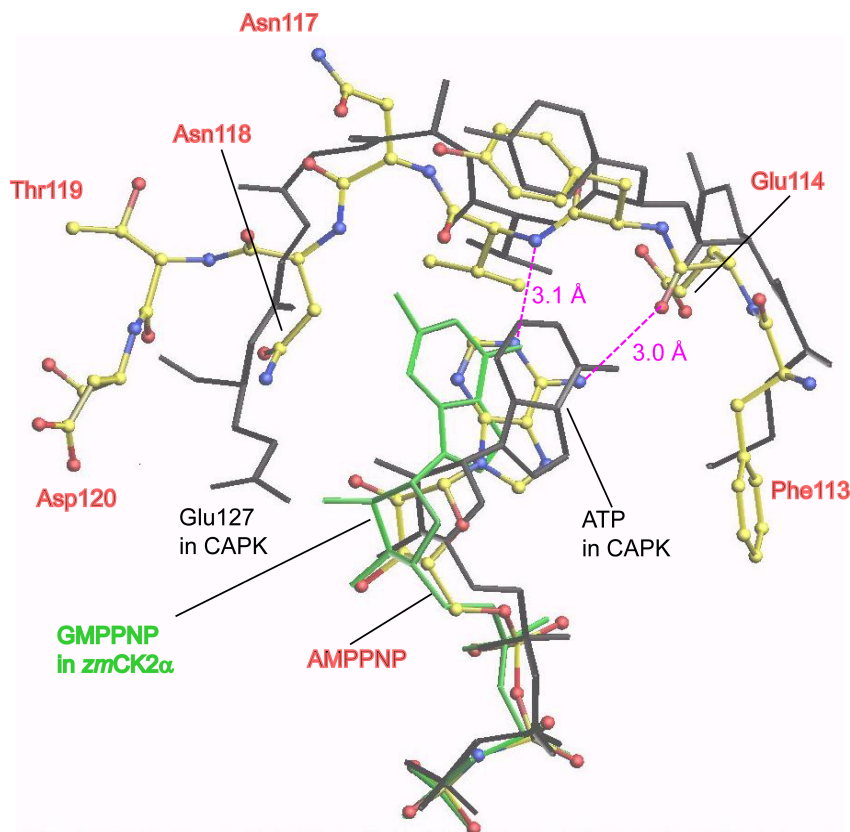


Abbildung 57: Vergleich der Co-Substrat-Bindung in den binären Komplexen *zmCK2α*/AMPPNP, *zmCK2α*/GMPPNP (PDB Code: 1DAW; 1DAY) mit dem ATP-Bindung in einem ternären Komplex der CAPK mit einem Inhibitor-Komplex (PDB-Code 1ATP).

5.1.2.1.2 Purinbindungsebene

Conformationale Plastizität der Aminosäure Met163

Sehr interessant ist die Rolle der Aminosäure Met163 in der Nukleotid-/Inhibitor-Bindung an die Co-Substrat-Bindungsstelle. Diese Aminosäure ist sehr beweglich trotz ihres robusten räumlichen Aufbaus. Bei dem Vergleich der beiden Strukturen von *zmCK2α* im Apo-Zustand und mit dem gebundenen Nukleotid beobachtet man, daß die Seitenkette von Met163 durch die Nukleotidbindung in einer Konformation fixiert wird, während im Apoenzym zwei alternative Konformationen vorkommen.

Im Fall der Co-Kristallisation von *zmCK2α* mit ihrem Inhibitor Tetrabromo-2-benzotriazol (TBB) ist diese Beweglichkeit von Met163 noch offensichtlicher. Es wurden vier alternativen Konformationen dieser Aminosäuren gefunden. Solches unterschiedliche Verhalten von Met163 deutet auf ihre wichtige Rolle bei der dualen Co-Substrat-Spezifität von Proteinkinase CK2.

Coplanarität der Bindung von Inhibitoren und Nukleotiden

Nach der Lösung der Strukturen *zmCK2α* im Komplex mit ihren ATP-kompetitiven Inhibitoren Emodin und Tetrabromo-2-benzotriazol (TBB) ist noch eine interessante Besonderheit der Bindung an der Co-Substratbindungsstelle aufgetreten (Battistutta R., et al., 2001; Battistutta R., et al., 2000). Und zwar, wurde es festgestellt, daß die co-kristallisierten Inhibitoren Emodin und TBB praktisch auf der Ebene der Purin-Base in der AMPPNP und GMPPNP liegen (Abbildung 58). Dabei die Wechselwirkungen zwischen Emodin und Protein und TBB und Protein hauptsächlich die hydrophobe Natur haben, während die Purin-Ringe der AMPPNP und GMPPNP bilden die Wasserstoffbrückenbindungen mit der Polypeptidkette der *zmCK2α*. Solche Orientierung der Inhibitoren hat auch bestimmte Folge für die Proteinkonformation, besonders in der Glycin-reichhaltige-Loop (Aminosäuren 42 - 50). Diese erstaunliche Coplanarität steht in dem Zusammenhang mit den Aminosäuren, die die hydrophobe Höhle in der Co-Substratbindungsstelle bilden. Meistens Aminosäuren an dieser Stelle sind zwischen den anderen Proteinkinasen hoch konserviert. Es gibt aber paar beachtenswerten Ausnahmen. Das sind die Aminosäuren Ile/Val66, die in anderen Proteinkinasen ausnahmslos durch die Aminosäure Ala ersetzt sind. Die zwei anderen Aminosäuren sind Ile174 und Met163. Die Ile174 wird praktisch immer durch die Aminosäuren Ala, Thr, Gly ausgetauscht. Statt der Aminosäure Met163 kommen in anderen Proteinkinasen die Homologe mit den kürzeren Seitenketten, meistens Leu. Im Vergleich mit anderen Kristallstrukturen der Proteinkinasen ist die aktive Co-Faktorbindungsstelle bei der CK2α wesentlich kleiner auf Grund von der robusten Seitenketten (Battistutta R., et al., 2001).

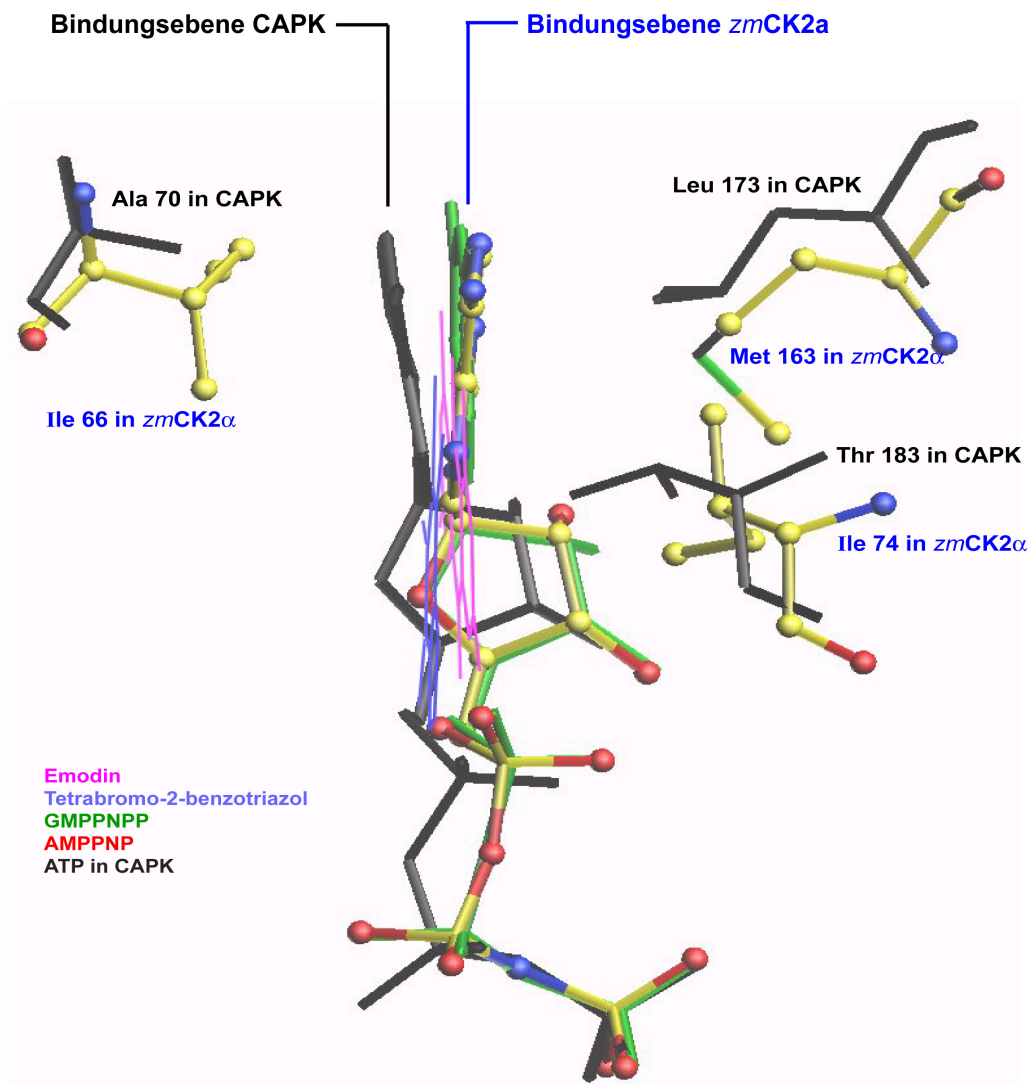


Abbildung 58: Coplanarität und die hydrophobe Umgebung in der Co-Substratbindungsstelle.

Bei der Betrachtung der Adenin-Base-Ebene des ATP-Moleküls, das an die CAPK gebunden war, konnte man die auffällige Verschiebung der Adenyl-Gruppe des ATP-Moleküls und Verkipfung der Adenin-Base in der Richtung der Aminosäure Ala66, die Ile66 in *zmCK2α* entspricht, beobachten (Abbildung 58). CAPK bindet ATP, zeigt aber keine duale Co-Substrat-Spezifität, die für CK2α charakteristisch ist. Der Grund dieses Unterschieds kann gerade an dieser Verkipfung der Bindungsebene liegen, was die Einschränkungen der zweidimensionalen Freiheit aufruft.

5.1.2.2 Rationales Protein-Design: die Mutante *hsCK2αΔC-V66A/M163L*

Diese alle strukturellen Beobachtungen brachten zur Idee eine Mutante herzustellen, wo die entscheidende Aminosäuren Val66/Ile66 und Met163 entsprechend durch die Aminosäuren Ala66 und Ile163 ausgetauscht sind (Tabelle 28).

Tabelle 28: Die ausgetauschte Aminosäuren in Proteinkinase *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L*

Protein	Aminosäure 1	Aminosäure 2
CAPK	Ala70	Leu173
<i>zmCK2α</i>	Ile66	Met163
<i>hCK2$\alpha$$\Delta$C</i>	Val66	Met163
<i>hCK2ΔC-V66A/M163L</i>	Ala66	Ile163

5.1.2.3 Kinetische Untersuchungen der hergestellten Mutante *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L*

Die Mutante *hsCK2 Δ C-V66A/M163L* wurde kinetisch charakterisiert (Yde C.W., Ermakova I., Issinger O.-G., Niefind K.; Publikation eingereicht) und einschließend kristallisiert. Die kinetischen Messungen sind in der Tabelle 29 dargestellt. Die Mutante wurde charakterisiert im Vergleich zu dem Wildtyp *hsCK2 α* und auch zur *hsCK2 α Δ C*, deren Kristallstruktur im folgenden Arbeit auch dargestellt ist.

Tabelle 29: Kinetische Charakteristik der hergestellten Mutante *hsCK2 Δ C-V66A/M163L* im Vergleich mit dem Wildtyp und *hsCK2 α* mit der Deletion an dem N-terminalen Ende.

Protein	ATP				GTP				Vergleich ATP/GTP $K_M(\text{GTP})/K_M(\text{ATP})$
	K_M [μM]	V_{\max} [$\mu\text{M}/\text{min}$]	K_{cat} [s^{-1}]	K_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]	K_M [μM]	V_{\max} [$\mu\text{M}/\text{min}$]	K_{cat} [s^{-1}]	K_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]	
<i>hsCK2α</i> (wild Type)	7.8	0.66	2.0	0.26	52	0.64	1.9	0.037	6.7
<i>hsCK2$\alpha$$\Delta$C</i>	8.3	0.85	2.3	0.28	47	0.73	1.9	0.041	5.7
<i>hsCK2$\alpha$$\Delta$C-V66A/M163L</i>	3.0	1.70	1.7	0.57	96	0.82	2.2	0.023	32.0

Die kinetischen Daten haben bestätigt, daß die Mutationen der Aminosäuren Val66 und Met163 durch entsprechende Ala66 und Leu163 die kinetischen Eigenschaften der Mutante sehr stark im Vergleich mit dem Wildtyp verändert haben. Der K_M -Wert für ATP wurde bis auf 3 μM reduziert, während der K_M -Wert für GTP von 47 μM bis auf 96 μM durch die Mutationen erhöht wurde. Somit haben die Mutationen eine sehr starke Reduzierung in der Bindungsaffinität von *hsCK2 α* -Mutante für GTP bewirkt. Der K_{cat}/K_M -Wert entspricht der Hälfte von der erhaltenden für *hsCK2 α Δ C*. Sowohl *hsCK2 α Δ C* als auch *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L* zeigen das gleiche Verhalten bezüglich der Co-Substrat-Bindung. Das spricht dafür, daß alle Veränderungen in der kinetischen Eigenschaften der Mutante nur von dieser Mutationen und nicht von der Deletion an dem C-terminalen Ende abhängig sind. Zusammengefasst, ist das Verhältnis $K_M(\text{GTP})/K_M(\text{ATP}) = 5.7$ für *hsCK2 α Δ C* und es wird erhöht bis auf 32 für *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L*. Um dieses Ergebnis richtig einschätzen zu können, muß man wissen, daß das höchste $K_M(\text{GTP})/K_M(\text{ATP})$ -Verhältnis, das bisher für eine

CK2 α -Mutante (nämlich für α /CK2 α -N118E) publiziert worden ist (Jakob G. et al, 2000), den Wert 10 beträgt. Die kinetischen Daten aus weiteren Mutagenese-Studien (Shrinivasan N. et al, 1999) zeigten, daß die hergestellten α /CK2 α -Mutanten praktisch identisch zu dem Wildtyp waren, d.h. sie verwendeten GTP genauso gut wie ATP bei der Phosphorylierung. Man kann also feststellen, daß durch Veränderung der Aminosäuren Val66 und Met163 eine Mutante erzeugt wurde, die hinsichtlich katalytischer Effizienz, Stabilität und Löslichkeit dem Wildtyp-Enzym gleicht, die jedoch eine deutliche Präferenz zugunsten von ATP aufweist. Die Lösung der Kristallstruktur der konstruierten Mutante erlaubte es, diese Bevorzugung von ATP gegenüber GTP zu erklären.

5.1.2.4 Kristallographische Studien der *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L*

hsCK2 α Δ C-V66A/M163L wurde in der Anwesenheit von AMPPNP und einem *in-vitro*-Peptidsubstrat, mit der Aminosäuresequenz RRRADDSDDDDD co-kristallisiert.

Die Kristalle gehören zur Raumgruppe P4₃2₁2 und enthalten ein Molekül pro asymmetrischer Einheit. Die ausgetauschten Aminosäuren befinden sich in der Mitte des Proteins (Abbildung 59), deshalb man hat erwartet das Wachstum der Kristallen bei der Kristallisationsbedingungen, die ähnlich zu der bekannten Kristallisationsbedingungen der CK2 α -Kristallen waren. Die Kristalle sind aber bei den Kristallisationsbedingungen gewachsen, die ganz unterschiedlich sind. Nämlich nicht in der Anwesenheit von PEG MME 5000 (wie *hsCK2 α Δ C*), sondern bei 2.3M *tri*-Na-Citrate.

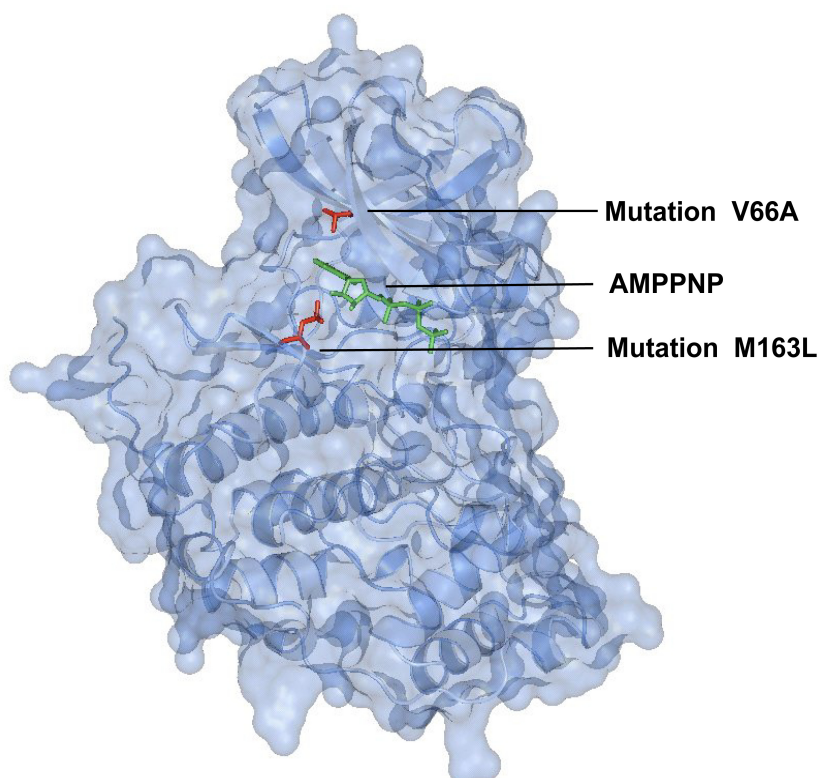


Abbildung 59: Die durchgeführte Mutationen in *hsCK2 α Δ C--V66A/M163L*

Es wurden zwei Datensätze gemessen, die dann mit Hilfe der Methode des Molekularen Ersatzes gelöst und bis 2.3 Å und 1.6Å verfeinert wurden. In beiden Fällen ist die Aminosäurekette gut über die ganze Länge definiert. Beim Vergleich der Kristallstrukturen von *zmCK2α* und *hsCK2αΔC-V66A/M163L* beobachtet man, daß die Mutante das Nukleotid nicht in der voll aktiven Konformation gebunden hat. Das AMPPNP-Molekül, das an *hsCK2αΔC-V66A/M163L* gebunden ist, ist frei von koordinierten Mg^{2+} -Ionen und die γ-Phosphatgruppe liegt nicht korrekt für den Phosphotransfer. Dieses Faktum ist wahrscheinlich eine Folge der hohen Salzkonzentration (2.3M Na-Citrate) in der Kristallisationslösung, denn *hsCK2α* verliert ihre Aktivität komplett bei NaCl-Konzentrationen höher als 500mM (Grankowski N., Boldyreff B., Issinger O.-G., 1991).

Die Mutante *hsCK2αΔC-V66A/M163L* wurde hergestellt, um die duale Co-Substratspezifität von *CK2α* zu erklären. Aber wie schon oben erwähnt wurde, wurden einige Konformationsveränderungen auch in einem Bereich festgestellt, der keine wichtige Rolle für die Co-Substraterkennung spielt. Gemeint ist geschlossene Konformation der β4/β5-Schleife im Vergleich zum offenen Zustand, wie er in den *hsCK2α*-Untereinheiten des *CK2*-Holoenzym gefunden worden war. Die erstmalige Entdeckung dieser holoenzym-inkompatiblen Konformation durch Ermakova I. et al (2003) war also offenbar kein Einzelfall. Möglicherweise liegt isolierte *hsCK2α* immer in dieser Form vor, was gut zu der derzeit viel diskutierten Möglichkeit paßt, daß *CK2α in vivo* unabhängig vom Holoenzym vorkommen kann.

Die größten Konformationsänderungen, die in den weiterfolgenden Kapiteln diskutiert werden, wurden im Bereich der Nukleotidbindung festgestellt. Trotz nicht ganz korrekter Positionierung des AMPPNP-Moleküls beobachtet man, daß der Adenin-Ring und Ribose-Ring ganz gut in der elektronen Dichte definiert sind. Es bilden sich die erwarteten Wasserstoffbrücken zur Seitenketten von Glu114 und Val116, die in allen Komplexen *zmCK2α* mit AMPPNP und CAPK mit ATP anwesend sind (Abbildung 57).

Wie erwartet, beobachtet man auf der Abbildung 60, daß bei der Bindung des Nukleotides an die *hsCK2αΔC*-Mutante die Orientierung des Adenins tatsächlich derjenigen im CAPK/ATP-Komplex entspricht. Man sieht die gleiche Verschiebung und Verkipfung der Adenin-Ring-Ebene in der Richtung der Aminosäure Ile66 wie in CAPK. So kann man vermuten, daß der Aminosäurenrest Ile174 ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Orientierung des Co-Substrates spielt. An dieser Stelle befindet sich in CAPK Thr 183, also eine Aminosäure, die zwar kleiner als Ile ist, die aber im CAPK/ATP-Komplex eine solche Konformation einnimmt, dass der Platz für den Adenin-Ring auf die gleiche Art und Weise wie durch Ile174 in *hsCK2αΔC-V66A/M163L* eingeschränkt wird.

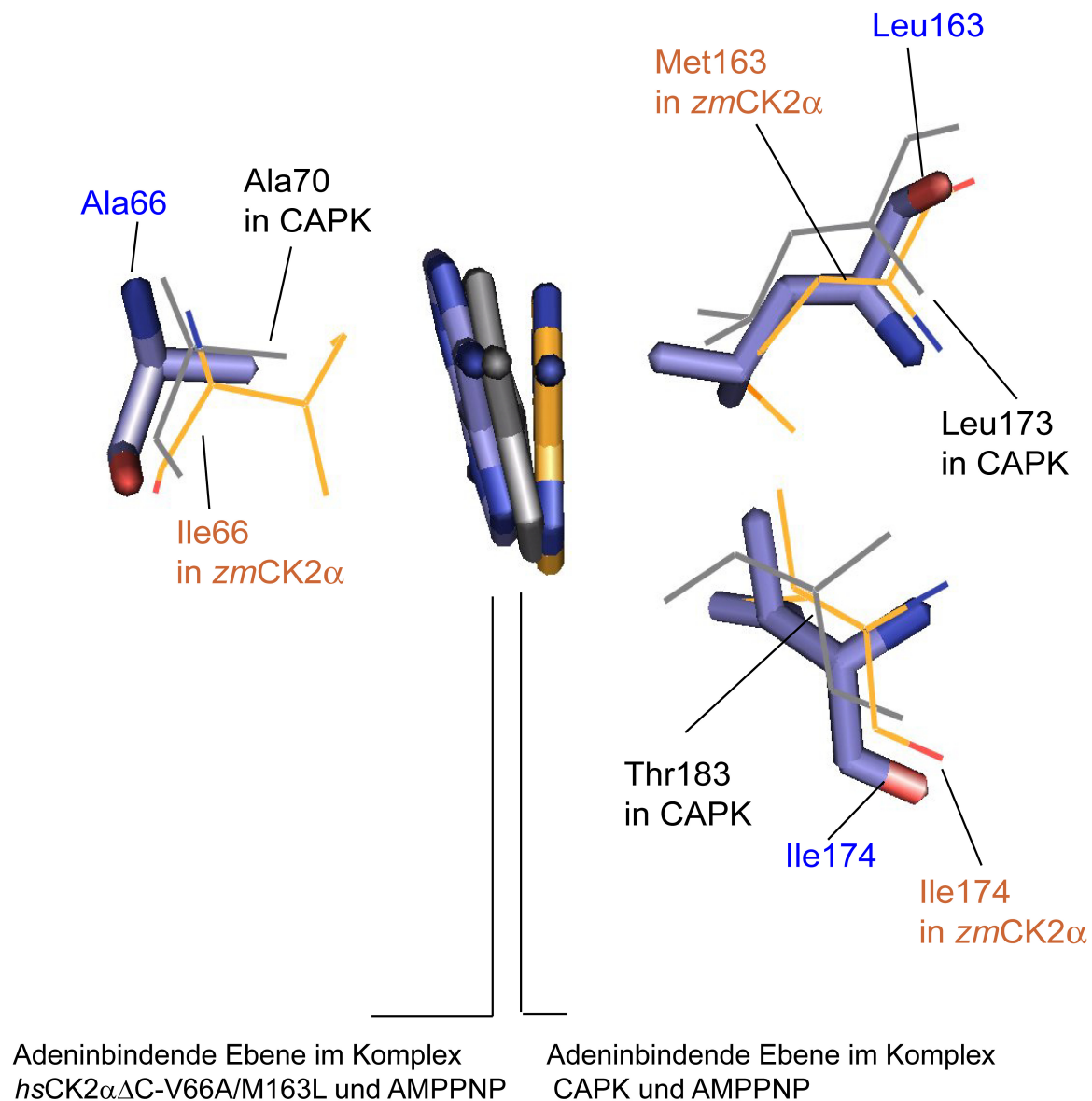


Abbildung 60: Verschiebung und Verkipfung der Co-Substratbindungsebene bei *hsCK2αΔC-V166A/M63L*. (Grau: CAPK; bunt-gelb: *zmCK2α* und blau: *hsCK2αΔC-V66A/M163L*).

Die erhaltenen kinetischen und strukturellen Daten bestätigen die Vermutung, daß in CK2α eine Korrelation zwischen der Orientierung der Purinebindungsebene und der Co-Substrat-Spezifität existiert.

Bei der Betrachtung der αD-Helix-Region in CAPK und *zmCK2α* (Abbildung 57) konnte ich einige sehr starke Abweichungen in diesem Bereich beobachten. In der Struktur von CAPK wird das AMPPNP-Molekül durch die Wechselwirkung mit der negativen Seitenkette Glu127 fixiert. Es bildet sich eine Art Co-Substrat-Anker durch die Wasserstoff-Brückenbindung der Hydroxylgruppe des Ribose-Ringes. Im Falle von *zmCK2α* befindet sich die analoge Aminosäure Asp120 zu weit von dem Ribose-Ring entfernt. Das gilt auch für *hsCK2α* im isolierten und *hsCK2β*-gebundenen Zustand (Ermakova I., 2003; Niefind K., 2000). Die auffälligste Besonderheit von CK2α im Vergleich mit der anderen Proteinkinasen in dieser Region ist die Abwesenheit dieses Co-Substrat-Ankers, wodurch sich wesentlich mehr Platz

für die Bindung des Nukleotides und somit eine erhöhte zwei-dimensionale Freiheit in der Purinbindungsebene ergibt.

Bei dem Vergleich der *hsCK2 α* Δ C-V66A/M163L Struktur mit der oben betrachteten Strukturen (Abbildung 61) konnte ich feststellen, daß α D-Helix-Bereich sehr große Veränderungen sogar im Peptidrückgrat vollzogen hat. Als Folge davon befindet sich Asp120 viel näher am Ribose-Ring des Nukleotides als in der Komplexen von *zmCK2 α* /AMPPNP und *hsCK2 α* Δ C/AMPPNP. Asp 120 wird stabilisiert in dieser CAPK-analogen Konformation durch die Aminosäure His 160, die sich in einer von *zmCK2 α* völlig unterschiedlichen Konformation befindet (Abbildung 62). Man kann somit vermuten, daß Asp120 ähnlich wie Glu127 in CAPK wirkt, d.h. den Ribosering des Nukleotids verankert. Diese Vermutung steht in der guten Zusammenstimmung mit der erhöhten Affinität von *hsCK2 α* Δ C-V66A/M163L für ATP (Tabelle 29).

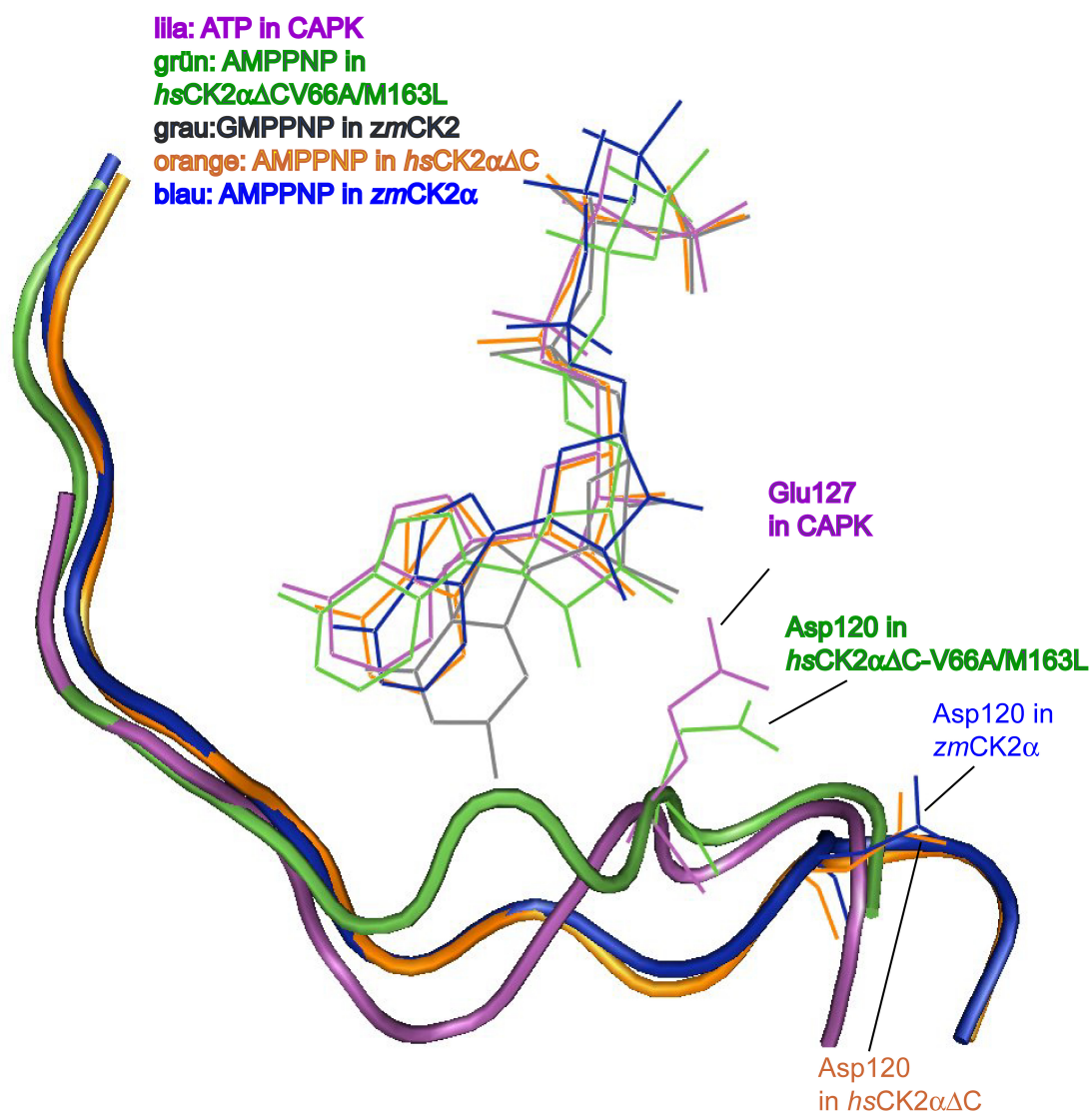


Abbildung 61: Verankerung des Riboseringes in CAPK, *zmCK2 α* , *hsCK2 α* Δ C und *hsCK2 α* Δ C-V66A/M163L. (Grün – CAPK, grau – *hsCK2 α* Δ C, gelb – *zmCK2 α* , blau - *hsCK2 α* Δ C-V66A/M163L)

Nicht nur Asp120, sondern die ganze Region von Asn114 bis zu Glu127 in *hsCK2αΔC-V66A/M163L* verschiebt sich durch die Mutagenese in Richtung des Nukleotides im Vergleich zu den *zmCK2α* oder *hsCK2αΔC* (Abbildung 62). Diese Beobachtung erklärt, warum es in der Mutante weniger Platz für die Nukleotidbindung gibt: Die Freiheit innerhalb der Purinbindungsebene, wie sie für *zmCK2α* gezeigt worden ist (Niefind et al., 1999) und wie man sie in Abbildung sehen kann, ist nicht mehr in gleichen Ausmaße vorhanden. Als Folge davon kann GTP weniger gut gebunden und umgesetzt werden, so wie es auch der erhöhte K_M -Wert zeigt (Tabelle 29).

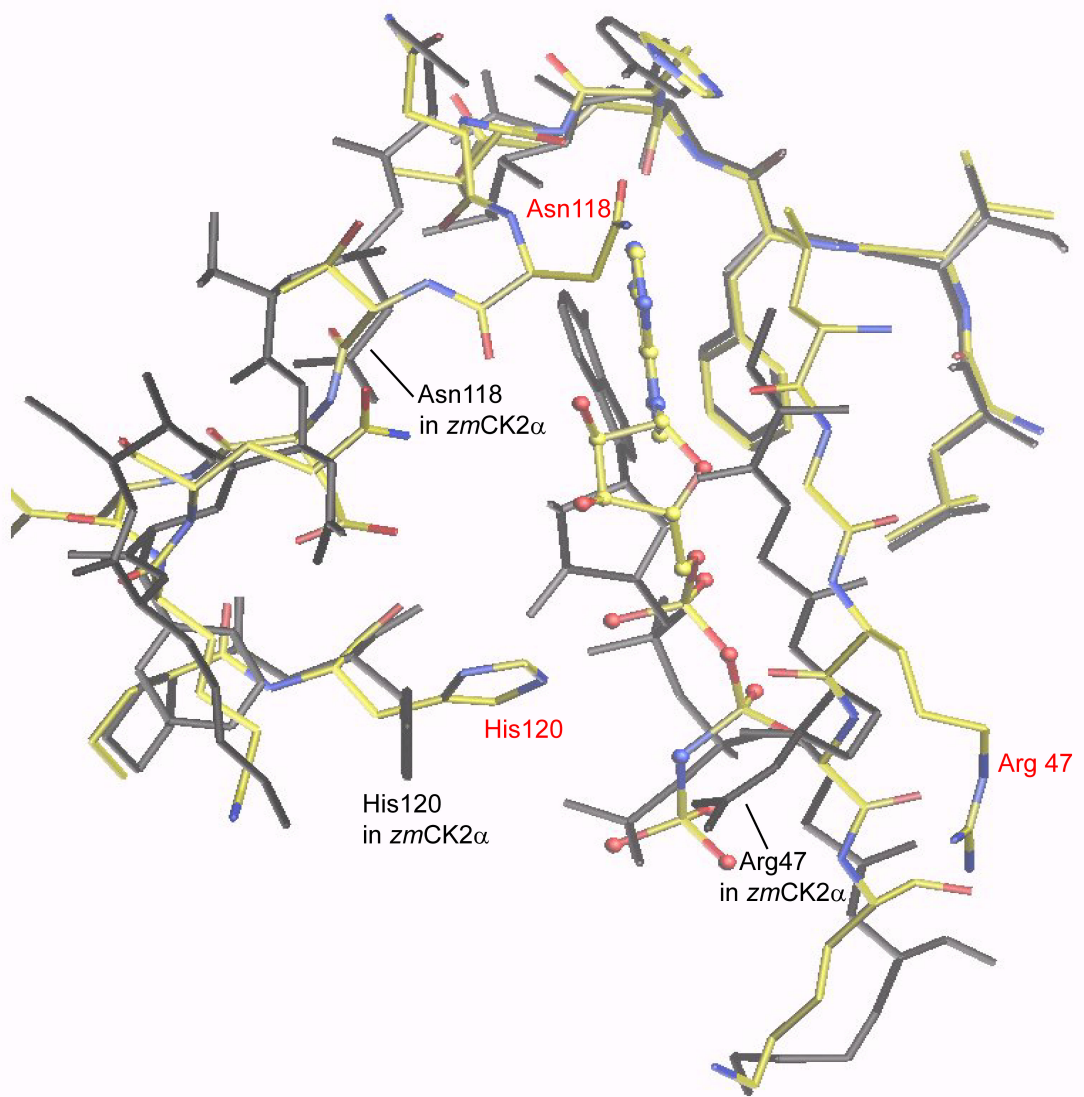


Abbildung 62: Die wichtigen Änderungen an der aktiven Stelle des AMPPNP/*hsCK2αΔC-V66A/M163L* – Komplexes in Vergleich mit dem AMPPNP/*zmCK2α*-Komplex. Grau – die Aminosäurenreste von *zmCK2α*; bunt – *hsCK2α-V66A/M163L* Aminosäurenreste; bunt – AMPPNP-Molekül in *hsCK2αΔC-V66A/M163L*; grau – AMPPNP-Molekül in *zmCK2α*.

5.2 Kalorimetrische Studien

5.2.1 Bindungsaffinität zwischen *hsCK2 β* und *hsCK2 α*

Die Proteinkinase CK2 wurde traditionell als ein stabiler heterotetramerer Komplex betrachtet. Für die Bildung dieses Komplexes ist die vorherige Bildung des CK2 β -Dimeres notwendig (Lüscher & Litchfield, 1994). In den letzten Jahren jedoch häuften sich Befunde, daß die individuellen Untereinheiten der CK2 selbstständig existieren und in den unterschiedlichen zellulären Reaktionen teilnehmen können (Guerra B., Issinger O.-G., 1999). Die Analyse der räumlichen Verteilung der Untereinheiten in der Zelle und deren Dynamik zeigte, daß sie unabhängig voneinander sind. Sie können verschiedene Wechselwirkungspartner haben und bilden nur im Falle von Co-Lokalisation Holoenzym (Martel V., et al., 2002).

Die Autoren Nooren I. M.A. Und Thornton J.M. (2003) führten die Begriffe "*obligate*" und "*non-obligate*" für die Charakterisierung der unterschiedlichen Typen von Proteinkomplexen ein. Die Protomere der obligaten Komplexe existieren nicht als selbstständige stabile Strukturen *in vivo*.

Im Unterschied dazu sind die Komponenten der nicht-obligaten Komplexe oft nicht ortsgebunden, stabil und existieren im freien Zustand unabhängig voneinander.

Protein-Protein-Komplexe unterscheiden sich auch nach ihrer Existenzdauer. Es gibt "*permanente*" Komplexe, die sehr stabil sind und nur in der Form des Komplexes existieren und "*transiente*" Komplexe, die leicht *in vivo* dissoziieren und assoziieren. Im letzteren Fall kann das oligomere Gleichgewicht zwischen unterschiedlichen Zuständen von der lokalen Umgebung kontrolliert werden. Z. B. bei einer Änderung der Protein- oder Ligandkonzentration oder bei einer Änderung des pH-Wertes kann das Assoziationsgleichgewicht verschoben werden. Es existieren schwache und starke transiente Assoziationen: die schwachen Komplexe stellen *in vivo* ein Gemisch von verschiedenen oligomeren Zuständen dar, starke Komplexe ändern ihre Quartärstruktur nur im Zusammenhang mit Konformationsänderungen oder Ligandenbindung (Nooren I.M.A. & Thornton J. M., 2003).

Mit diesen Definitionen mußte man CK2 aus traditioneller Sicht also als permanenten und obligaten Komplex bezeichnen. Das änderte sich mit der Kristallstruktur des CK2-Holoenzymes (Niefind K., et al., 2001). Sie ergab, daß die α/β -Kontaktfläche im Holoenzym 832Å betrug, was nach Jones & Thornton (Abbildung 63) für einen nicht-obligaten Komplex spricht.

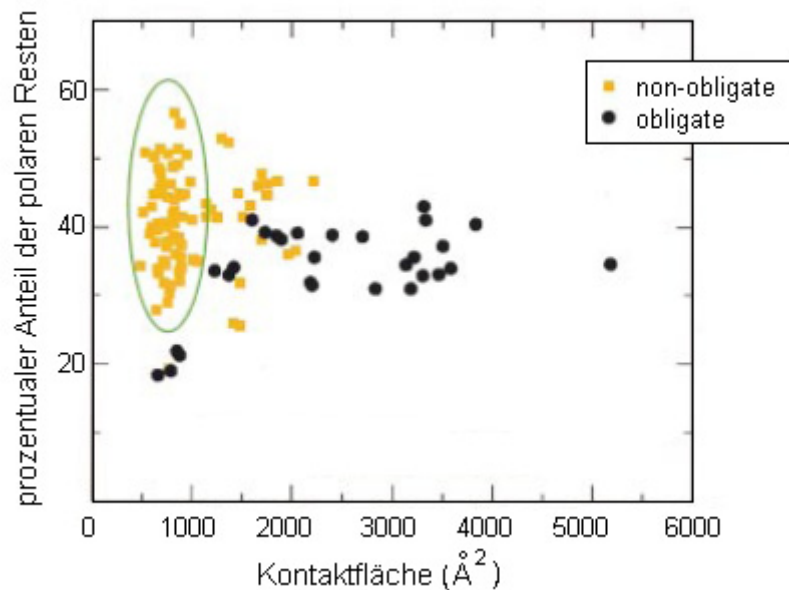


Abbildung 63: Kontaktfläche und Polarität der Grenzflächen von unterschiedlichen obligaten und nicht-obligaten Komplexen. (Nooren I.M.A. & Thornton J.M., 2003)

Die K_b -Werte, die aus den ITC- und DSC-Messungen bestimmt wurden, sind eine sehr gute Bestätigung der nicht-obligaten Natur der *hsCK2*-Holoenzymes. Die Daten aus den ITC-Messungen stimmen auch sehr gut mit den Daten überein, die durch die Oberflächenplasmonresonanz (SPR) erhalten wurden (Martel V., et al., 2002). Die Bindungskonstante zwischen *hsCK2α* und *hsCK2β*, die mit dieser Methode erhalten wurde, entspricht $K_b = 5.4 \cdot 10^9 \text{M}^{-1}$. Dieser Wert weicht ein bißchen von den in dieser Arbeit erhaltenden Werten ab ($K_b = 1.82 \cdot 10^8 \pm 5.7 \cdot 10^7 \text{M}^{-1}$), was an dem Unterschied der angewendeten Methoden liegen kann. Bei der SPR-Methode befindet sich ein Molekül auf der Oberfläche eines Trägers, und dem zweiten ist es erlaubt, vorbei zu fließen. Die Bindung wird registriert als die Änderung des Brechungskoeffizienten an der Sensoroberfläche – eine Folge der Komplexbindung. Die Bindung findet an der Oberfläche des Trägers statt. Nach der Meinung einiger Wissenschaftler kann das eine Schwäche dieser Methode sein. (Hensley P., 1996).

Die Bindungskonstante zwischen *hsCK2α* und *hsCK2β* zeigt die hohe Affinität zwischen beiden Proteinen, aber der Wert ist doch noch nicht hoch genug, um von einem obligaten Komplex zu sprechen. Außerdem, wird mit diesem Wert nur das Verhalten des Proteins *in vitro* charakterisiert. Deshalb wurde die Bestimmung der Bindungskonstante in der Anwesenheit von 1M Glycin durchgeführt, um die osmotischen Bedingungen in der Zelle zu simulieren (Abbildung 42). In der Anwesenheit von Glycin ist der K_b -Wert der Bindung zwischen der *hsCK2α* und *hsCK2β* deutlich kleiner und entspricht $K_b = 3.78 \cdot 10^6 \pm 5.1 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$. Diese Werte korrelieren sehr gut mit Kenntnissen aus "live-cell imaging"-Untersuchungen, mit denen Erkenntnisse über die Dynamik der einzelnen Untereinheiten gewonnen wurden (Filhol O. et al, 2003). Es wurde festgestellt, daß die einzelnen *hsCK2*-Untereinheiten hoch

mobile Proteine sind und daß diese Bewegungen voneinander unabhängig sind. Die Messungen haben auch gezeigt, daß die Mehrheit der beiden Proteine nicht als *hsCK2*-Holoenzym vorliegt.

Um Fehler und falsche Schlüsse auszuschließen, wurden zusätzlich DSC-Messungen durchgeführt und die Bindungskonstanten zwischen der *hsCK2α* und *hsCK2β* mit dieser unabhängigen Methode bestimmt.

In dieser Arbeit ging ich davon aus, daß die Wechselwirkung zwischen den beiden Untereinheiten als folgende Gleichung dargestellt werden kann (Abbildung 64):

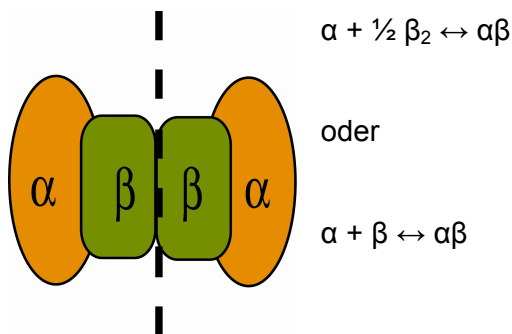


Abbildung 64: Modell der Struktur von Protein Kinase CK2.

Das angewendete Modell für die Bestimmung der Bindungskonstante mittels DSC-Messungen geht davon aus, daß keine Bindung des Liganden an die entfaltete Form stattfindet (Brandts J.F. & Lin L.-N., 1990). Die Bindungskonstanten wurden nach der Gleichung (11) berechnet. Der durchschnittliche Wert der Bindungskonstanten entspricht $K_b = 1.94 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Tabelle 26). Die Daten sind in guter Übereinstimmung mit den Daten aus den ITC-Experimenten.

Am Ende der DSC-Messungen waren die Proben offensichtlich aggregiert. Nach der üblichen Korrektur der Grundlinie zeigten die Thermogramme negative Werte der Denaturierung. Das kann die Folge einer Verschiebung des Schmelzpunktes zu höherer Temperatur aufgrund der Aggregation sein. Im Fall einer irreversiblen Denaturierung ist der Wert dieser Analyse begrenzt, denn die irreversible Veränderung der Proteine ist ein kinetischer Prozess, der mit Hilfe der Gleichgewichtsthermodynamik nicht beschrieben werden kann. In der Praxis gibt es trotzdem viele Fälle von irreversibler Denaturierung, wo das „*two-state kinetic model*“ für die Interpretation solcher Thermogramme angewendet wurde. Dieses Modell setzt eigentlich voraus, daß keine irreversible Denaturierung stattfindet.

Es wurden theoretische Simulationen des Einflusses der Heizrate auf die Übergänge durchgeführt. Diese Untersuchungen haben demonstriert, daß die kinetischen Verzerrungen aufgrund der irreversiblen Prozesse bei genügend hoher Heizrate unbedeutend klein sind. Das Limit der Heizrate des verwendeten DSC-Gerätes ist ziemlich begrenzt (bis zu $90^\circ/\text{h}$).

Und sehr oft sind die Verzerrungen, die durch die Denaturierung verursacht werden, selbst bei der höchsten Heizrate nicht beseitigt.

Es gibt auch eine Reihe von Publikationen, in denen die Bindungskonstanten für quasi-reversible Prozesse berechnet wurden. Dies konnte man z.B. (Mizuno K. et al., 2004) durch die Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid erreichen, dessen Zugabe in kleinen Mengen mindestens teilweise die Aggregation des Proteins beseitigt. Die Autoren haben festgestellt, daß die irreversiblen Prozesse (inklusive Aggregation) nur unbedeutend die gemessenen T_m -Werte ändern. Dieses Faktum nehmen sie als Argument für die Zuverlässigkeit der Daten, die in Abwesenheit von Guanidiniumhydrochlorides erhalten wurden und betrachten die DSC-Methode auf jedem Fall als eine gute Möglichkeit für die Abschätzung von Bindungskonstanten.

In dieser Arbeit wurden auch DSC-Messungen in Anwesenheit von 1M Glycin durchgeführt. Die Thermostabilität aller untersuchten Proteine (*hsCK2 α* Δ C, *hsCK2 β* , *hsCK2*-Holoenzym) hat sich wesentlich erhöht (Tabelle 26). Die Stabilisierung von globulären Proteine ist eine bekannte Eigenschaft des Glycins und von Glycinderivaten. In einigen Fällen kann das Ausmaß der Stabilisation sehr spürbar sein: Der T_m -Wert wird um mehr als 22°C erhöht (Santoro et al., 1992). Der genaue Mechanismus der Proteinstabilisierung in Anwesenheit von Osmolyten ist bis jetzt unklar (Cooper A., 1999).

Die gemessenen Bindungskonstanten K_b zwischen der *hsCK2 β* und *hsCK2 α* in Anwesenheit von 1M Glycin haben den durchschnittlichen Wert von $2.13 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Tabelle 26). Er spricht dafür, daß unter zellulären Bedingungen die einzelnen Untereinheiten relativ mobil sind und das *hsCK2*-Holoenzym *in vivo* mit der freien *hsCK2 β* - und *hsCK2 α* -Untereinheiten co-existieren kann. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der FLIP- Analyse („*Fluorescence Loss In Photobleaching*“). Mit dieser Methode wurde festgestellt (Filhol O. et al., 2003), daß die Komponenten des CK2-Holoenzymkomplexes zu der Familie der hoch mobilen nuklearen Proteinen gehören. Das kinetische Verhalten von jeder Untereinheit ist jedoch unterschiedlich. Außerdem unterscheidet man die Population der schnell- und der langsam-bewegenden Proteine, was auch von der Anwesenheit potentieller Bindungspartner in der Zelle abhängig ist. Die Autoren bieten folgendes Modell der subzellulären Lokalisierung der CK2-Untereinheiten an (Abbildung 65).

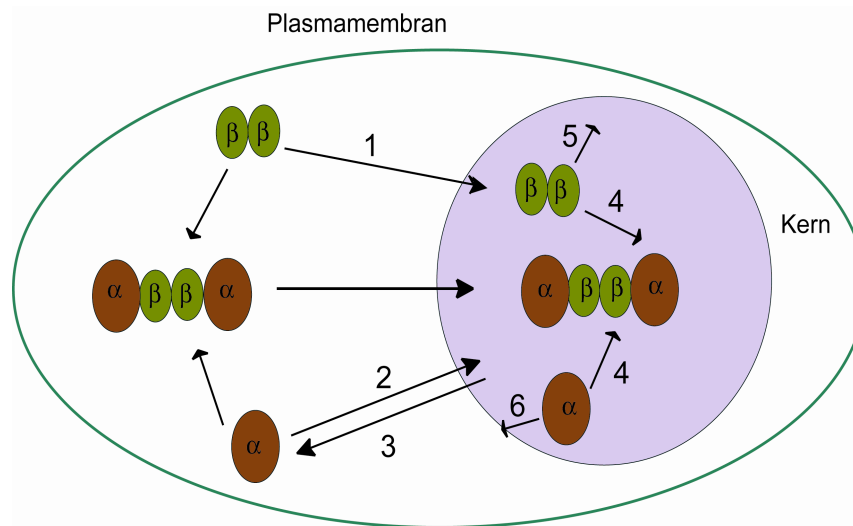


Abbildung 65: Das Modell der intrazellulären Dynamik der CK2-Untereinheiten. (1, 2) – jede neu aufgebaute CK2-Untereinheit wird nach eigener Art in den Zellkern importiert. (3) – im Gegensatz zu CK2β kann CK2α aus dem Zellkern zurück exportiert sein. (4) – In den Zellkern können die Untereinheiten mit hohen Geschwindigkeiten importiert werden, wo sie miteinander zufälligerweise unter Holoenzymbildung assoziieren können oder (5,6) – mit passenden Wechselwirkungspartnern oder Zellkernstrukturen wechselwirken, was sich an der Existenz einer Unterpopulation von langsam-bewegenden CK2-Untereinheiten zeigt. (Filhol et al., 2003)


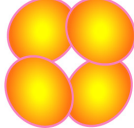
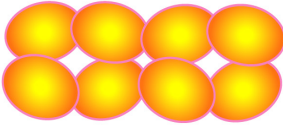
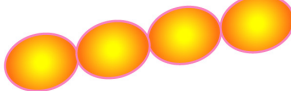
Alle diese Befunde, so wie auch die in dieser Arbeit vorgestellte Bindungskonstanten zwischen den beiden CK2-Untereinheiten passen nicht zu dem historischen Konzept des „festverdrahteten“ Holoenzymes, das CK2 in der Zelle als nicht-dissoziierbaren Komplex betrachtet.

5.2.2 Strukturelle Basis der Thermostabilität des *h*CK2-Holoenzymes und seiner einzelnen Untereinheiten

Bei Zugabe von CK2β- zur CK2α-Untereinheit, steigt normalerweise die enzymatische Aktivität um einen Faktor von bis zu 10 und erreicht ihr Maximum bei einem Verhältnis von $\alpha : \beta = 1 : 1$. Eine Ausnahme ist das Substrat Calmodulin, in dessen Anwesenheit CK2β einen inhibierenden Effekt zeigt (Boldyreff B. & Issinger O.-G., 1999). Es wurde festgestellt, daß die katalytische Aktivität des CK2-Holoenzymes von der molekularen Form der CK2 abhängig ist. Und zwar kann das CK2-Holoenzym in unterschiedlichen oligomeren Zuständen existieren. Diese Zustände sind sehr von der Ionenstärke der Lösung abhängig (Valero E. et al., 1995). So tritt CK2 bei hohen NaCl-Konzentrationen ($C(\text{NaCl}) > 0.5\text{M}$) als kugelförmiges Teilchen auf, dessen durchschnittlicher Durchmesser dem $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer entspricht (Tabelle 30). Bei niedrigeren Salzkonzentrationen, z.B. 0.3MNaCl , assoziieren die Heterotetramere sich zu ringförmigen Strukturen mit einem Durchmesser, der vier kreisförmig gebundenen $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetrameren entspricht. Bei noch niedrigerer

Ionenstärke existieren unterschiedliche oligomere Strukturen, die als dünne und dicke Filamente bezeichnet werden.

Tabelle 30: Schematische Darstellung der oligomeren Zuständen von Proteinkinase CK2 bei unterschiedlichen Ionenstärke der Lösung

Oligomere Zustände der Proteinkinase CK2			
			
Heterotetramer	Ring	Dickes Filament	Dünnes Filament
$\alpha_2\beta_2$	$(\alpha_2\beta_2)_4$	$[(\alpha_2\beta_2)_4]_n$	$(\alpha_2\beta_2)_n$
$c > 0.5M$ NaCl	$c \leq 0.3M$ NaCl	$c = 0.1M$ NaCl	

Mit den aus den DSC-Messungen erhaltenen Daten, kann man diese Tendenz von CK2, unterschiedliche oligomere Strukturen zu bilden, nachvollziehen.

Das Verhalten für die *hsCK2* bei 0.3M NaCl und 1M NaCl ist sehr unterschiedlich (Abbildung 47, Tabelle 27). Das Protein wird viel stabiler bei der höheren Ionenstärke. Bei 0.3MNaCl beobachtet man zwei Peaks auf dem DSC-Thermogramm. Man kann vermuten, daß der erste T_{m1} -Wert zu den gebildeten Ringstrukturen gehört, der zweite T_{m2} -Wert charakterisiert die Thermostabilität der Heterotetramere. Bei 1.0M NaCl erscheint auf dem Thermogramm nur ein Peak, der dem T_{m2} -Wert bei den Messungen mit 0.3M NaCl nahe kommt. Bei 1.0M NaCl kann man die Anwesenheit von Ringstrukturen der *hsCK2* völlig ausschließen. Man kann darausschließen, daß der T_{m1} -Wert bei diesen Messungen die Heterotetramerbildung charakterisiert dar.

Viele Polyamine und insbesondere Spermin sind wirksame Stimulatoren der Aktivität von CK2. Dieser Effekt wird durch ionische Wechselwirkungen zwischen vier Glutaminsäureresten der N-terminalen Domäne der *hsCK2* β -Untereinheit und vier positiven Ladung des Spermins erklärt (Leroy D. et al., 1997). Die Abbildung 66 stellt schematisch diese Modellvorstellungen dar.

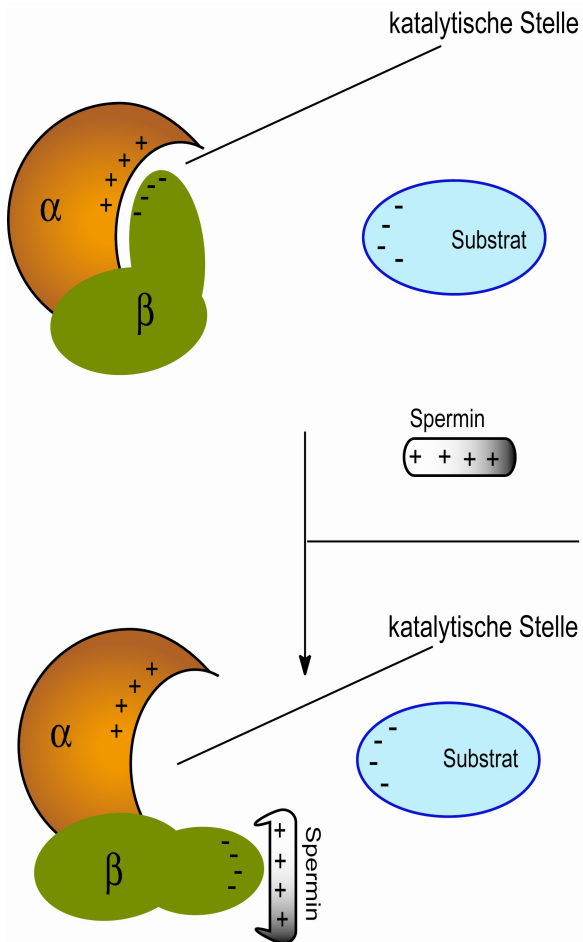


Abbildung 66: Schematische Darstellung der Stimulierung von CK2-Aktivität in der Anwesenheit von Spermin.

Die Sperminzugabe führt zur Freisetzung des Bereiches der Polyaminbindung, das katalytische Zentrum der CK2 α -Untereinheit wird frei für die Substratbindung.

Bei meinen DSC-Messungen habe ich festgestellt, daß die Anwesenheit von Spermin das CK2-Holoenzym destabilisiert (Abbildung 47). Gewöhnlich erhöht sich der T_m -Wert, wenn der Ligand an das Protein im nativen Zustand bindet. Wenn also Spermin den T_m -Wert des CK2_holoenzym senkt, so spricht das dafür, daß Spermin sich an die denaturierte CK2 β -Untereinheit des Holoenzymes bindet.

Heparin bindet sich spezifisch an die CK2 α -Untereinheit des Holoenzymes, wirkt als Inhibitor der CK2 und CK2 α , und hat keinen Effekt auf andere Proteinkinasen (Hathway G.M. et al., 1980). Man schreibt dem Heparin viele biologische Aktivitäten zu, wie z.B. Antikoagulation, Regulation der Zell-Differentiation und -Wachstum. Andererseits wird erhöhte CK2-Aktivität immer wieder in allen menschlichen Karzinomen und experimentellen Tumoren gefunden. Es wurde nicht nur eine Funktion von CK2 bei der Vermehrung von Zellen bei der Tumorentwicklung festgestellt, sondern auch ihre Einwirkung auf die Fehlbildung in Krebszellen (Unger G. M., 2004). Wie die DSC-Messungen zeigen, ist Heparin ein Stabilisator von Proteinkinase CK2 (Abbildung 47, Tabelle 27). Die T_m -Werte in der Anwesenheit von Heparin wurden wesentlich erhöht, und zwar bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen.

Die gleiche Wirkung hat Heparin auch auf die Thermostabilität von CK2 α -Untereinheiten.

Auf die Thermostabilität von hCK2 β -Untereinheit hat Heparin keinen Einfluß. Die T_m -Werten verschieben sich im Falle des CK2-Holoenzym in Richtung der Bildung von Heterotetrameren, also stabileren oligomeren Zuständen.

Es ist bekannt (O' Farrell F., et al., 1999), daß die Mutation der Lysinreste K74-77 zu Alanin restlos die Inhibierung der CK2 oder CK2 α bei Heparin beseitigt, während Mutationen des Clusters R191, R195, K198 zu Alanin die Heparin-Bindung um den Faktor 100 mindert. Sowohl der Mechanismus der Inhibierung durch Heparin auf die CK2-Aktivität als auch der stimulierende Effekt von Spermin können durch die Wechselwirkungen dieser Stoffen mit den Untereinheiten des Holoenzymes erklärt werden (Abbildung 67).

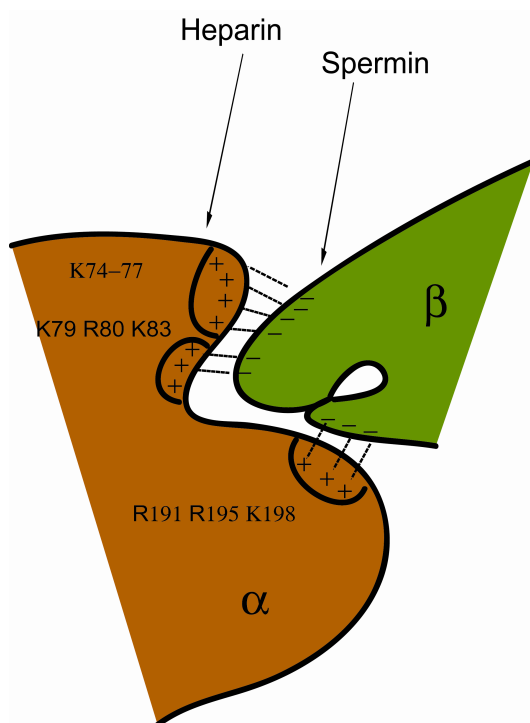


Abbildung 67: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen den CK2 α - und CK2 β -Untereinheiten im Holoenzym (Sarno et al., 1997).

Heparin wechselwirkt mit der CK2 α -Untereinheit und schafft damit ein Hindernis für die Substratbindung, so daß die Aktivität der CK2 sinkt.

Spermin macht die Wechselwirkungen mit der CK2 β -Untereinheit, wodurch eine geöffnete Konformation des Holoenzym entsteht und so das Substrat einen Zugang zum aktiven Zentrum bekommt.

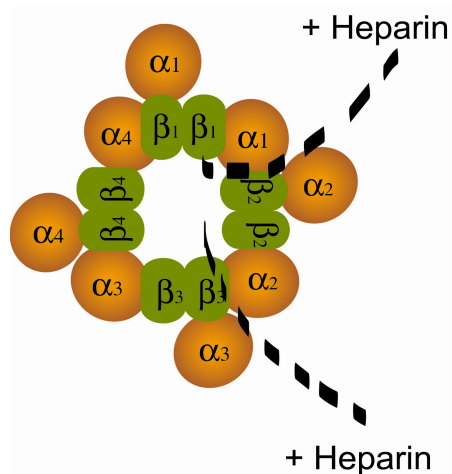


Abbildung 68: Darstellung der stabilisierenden Heparin-Wirkung auf die Proteinkinase CK2.

Die Wechselwirkung zwischen Heparin und dem CK2-Holoenzym oder zwischen Spermin und dem Holoenzym führt zur Zerstörung der ring-förmigen Strukturen. Dabei bilden sich stabilere CK2-Heterotetramere (Abbildung 68).

Das Verhalten der isolierten CK2α-Untereinheit wurde auch mit der Hilfe von der Elektronenmikroskopie untersucht (Valero E., et al., 1995). Es wurde festgestellt, dass sich CK2α bei den unterschiedlichen Salzkonzentrationen gleich verhält. Man beobachtete in Gegenwart von CK2β nur die Anwesenheit homogener Populationen der kugelförmigen Strukturen, was für die Notwendigkeit der CK2β-Teilnahme in dem Prozess der CK2-Selbstpolymerisation sprach.

Ich habe DSC-Messungen zur Untersuchung der Thermostabilität von *hsCK2α* in der *hsCK2β*-Anwesenheit durchgeführt. Die Daten zeigen (Abbildung 48, Tabelle 27), daß *hsCK2β* einen stabilisierenden Effekt auf die *hsCK2α*-Untereinheit hat. Man beobachtet eine Schmelztemperatur, die sowohl bei 0.3M NaCl als auch bei 1.0M NaCl die Position des *hsCK2*-Holoenzym entspricht (Abbildung 47). Bei der niedrigen Ionenstärke des Puffers erscheinen zwei Peaks, deren T_m -Werte den T_m -Werte T_{m1} und T_{m2} im Fall des Holoenzym entsprechen.

6 Zusammenfassung

Bei dieser Arbeit ging es darum, verschiedene wissenschaftliche Fragestellungen im Zusammenhang mit der Proteinkinase CK2 zu klären. Zunächst sollte die strukturelle Basis der Substraterkennung aufgedeckt werden. Zwar konnte trotz umfangreicher Kristallisationsstudien keine Struktur eines ternären Komplexes aus Enzym, Substrat und Cosubstrat aufgeklärt werden, dennoch wurde jenes Ziel weitgehend erreicht, weil erstmals die Struktur von CK2 α im Komplex mit zwei Anionen (Sulfationen) beschrieben werden konnte, die die entscheidenden Bindungs- und Erkennungsstellen für Substratproteine markieren.

Eine weitere Fragestellung betraf die duale Cosubstratspezifität der CK2, d.h. das Vermögen des Enzyms, neben ATP auch GTP umzusetzen. Ein Grundverständnis für dieses Phänomen war durch die Diplomarbeit Michael Pütters (Pütter, 1998) schon vorhanden; in dieser Arbeit jedoch konnte es durch Strukturaufklärung einer CK2 α -Mutante mit einer deutlichen Präferenz für ATP vertieft werden. Dabei zeigte sich, daß die Orientierung der Bindungsebene der Purinbase des Nukleotids und die Konformation in der Region der Helix α D entscheidende Determinanten in diesem Zusammenhang sind.

Schließlich sollte die Architektur des CK2-Holoenzym untersucht werden, als es bis zum Beginn dieser Arbeit der Fall gewesen ist. Durch umfassende Kristallisationsexperimente konnten neue Kristallformen des humanen CK2-Holoenzym entdeckt werden. In hochqualitativen Kristallstrukturen von Mutanten der humanen CK2 α wurde festgestellt, daß dieses Enzym, wenn es frei von CK2 β vorliegt, eine Konformation einnimmt, die zur Bildung des CK2-Holoenzym nicht geeignet ist.

Zu diesem Befund passen Ergebnisse, die durch kalorimetrische Methoden gewonnen werden konnten. Sie zeigen, daß die Bindung von CK2 β an CK2 α zwar fest ist, daß das CK2-Holoenzym aber dennoch einen transienten Charakter aufweist, daß also die Untereinheiten zusammen mit dem Komplex co-existieren können. Insbesondere konnte demonstriert werden, daß die Bindung durch erhöhte Osmolytkonzentrationen, wie sie im physiologischen Zustand typisch sind, abgeschwächt wird.

7 Ausblick

- 1) Einbeziehen in der Untersuchungen von Proteinkinase CK2 anderer Spezies als Mensch.
- 2) Herstellung des ternären Komplexes von CK2. Optimierung der gefundenen Kristallisationsbedingungen der beiden Proteinen durch die Erhöhung der Konzentrationen von Cosubstrat, Substrat und Mg^{2+} -Ionen. Was besonders günstig im Falle der Mutante *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L* sein sollte, deren Kristalle in der Salzhaltigenlösungen gewachsen sind.
- 3) Co-Kristallisation der CK2 α oder CK2 mit ADP in der Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen und Aluminium Fluorid (AlF_3). Denn die erhaltende Konfiguration zwischen der AlF_3 und ADP ist viel flacher, als AMPPNP, was mögliche sterische Schwierigkeiten bei der Peptidbindung erleichtern soll.
- 4) Herstellung der Mutante *hsCK2 α Δ C-V66A/M163L/I174T* mit dem Zweck der weiteren Untersuchung und Erklärung der Cosubstrat-Spezifität.
- 5) Weitere Optimierung und Untersuchung der Bindungsaffinität zwischen den CK2 α und CK2 β -Untereinheiten mit der isothermalen Titrationskalorimetrie.
 - Die Bestimmung der Bindungskonstante zwischen der *hsCK2 α* und *hsCK2 β* bei den unterschiedlichen Salzkonzentrationen.
 - Die Untersuchung der Bindungsaffinität zwischen den *spCK2 α* und *spCK2 β* -Untereinheiten, deren Herstellung als Holoenzym unerklärbare Schwierigkeiten hatte.
 - Die Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen den möglichen Wechselwirkungspartnern von CK2-Untereinheiten.
- 6) Die Kristallisation der *hsCK2* und *hsCK2 α* in der Anwesenheit von Glycin auf Grund der erhöhten Thermostabilität dieser Proteinen in der Anwesenheit von 1M Glycin, was durch die DSC-Messungen festgestellt wurde,

8 Literaturverzeichnis

Ahmed L., Gerber D. A., Cochet C. (2002). Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2., *Trends in Cell Biol.*, **12** (5), 226-230

Allende J. E., Allende C. C. (1995). Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation., *The FASEB J.*, **9**, 313-323

Aoki M., Yokota T., Sugiura I., Sasaki C., Hasegawa T., Okumura C., Ishiguro K., Kohno T., Sugio S., Matsuzaki T. (2003). Structural insight into nucleotide recognition in tau-protein kinase I / glycogen synthase kinase 3B. *Acta Cryst.*, **D60**, 439-446.

Battistutta R., De Moliner E., Sarno S., Zanotti G., Pinna L.A. (2001). Structural features underlying selective inhibition of protein kinase CK2 by ATP site-directed tetrabromo-2-benzotriazole. *Prot. Science*, **10**, 2000-2006

Battistutta R., Sarno S., De Moliner E., Marin O., Issinger O.-G., Zanotti G., Pinna L.A. (2000^a). The crystal structure of the complex of Zea mays α subunit with a fragment of human β subunit provides the clue to architecture of protein kinase CK2 holoenzyme. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5184-5190

Battistutta R., Sarno S., De Moliner E., Papinutto E., Zanotti G., Pinna L.A. (2000^b). The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.*, **275**, 29618-29622

Bax B., Garter P. S., Lewis C., Guy A. R., Bridges A., Tanner R., Pettman G., Mannix C., Culbert A. A., Brown M. J. G., Smith D. G., Reith A. D. (2001). The structure of phosphorylated GSK-3 β complexed with a peptide, FRATtide, that inhibits β -catenin phosphorylation. *Structure*, **9**, 1143-1152

Bertrand J. A., Thieffine S., Vulpetti A., Christiani B., Knapp S., Kalisz H. M., Flocco M. (2003). Structural characterization of the GSK-3 β active site using selective and non-selective ATP-mimetic inhibitors. *J. Mol. Biol.*, **333**, 393-407

Boldyreff B., Issinger O.-G. (1999). Protein Kinase CK2: From a Molecular Biology Approach to Protein Function. 15 Years of Protein Kinase CK2 Research at the Institute of Human Genetics in Homburg, 1981 – 1995

- Boldyreff B., Issinger O.-G. (1997). A-Raf kinase is a new interacting partner of protein kinase CK2 beta subunit. *FEBS Lett.*, **403** (2), 197-199
- Borek D., Minor W., Otwinowski Z. (2003). Measurement errors and their consequences in protein crystallography. *Acta Cryst.*, **D 59**, 2031-2038
- Brunger A. T., Adams P. D. et al. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* Sep 1; **54** (Pt 5): 905-921
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-binding dye. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254
- Brandts J. F., Lin L.-N. (1990). Study of strong protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry* **29**, 6927- 6940
- Brown N. R., Noble M. E. M., Endicott J. A. Johnson L. N. (1999). The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 438-443
- Buchou T., Vernet M., Blond O., Jensen H. H., Pointu H, Olsen B. B., Cochet C, Issinger O.-G., Boldyreff B. (2003). Disruption of the Regulatory β Subunit of the Protein Kinase CK2 in Mice Leads to a Cell-Autonomous Defect and Early Embryonic Lethality. *Mol. And Cel. Biol.*, **23** (3), 908-915
- Cohen P. (2002). The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biol.*, **4**, E127-E130
- Chantalat L., Leroy D., Filhol O., et al. (1999). Crystallisation and preliminary X-ray diffraction analysis of the regulatory subunit of human protein kinase CK2. *Acta Crystallogr.*, **D55**, 895-897
- Chardot T., Shen H., Meunier J.-C. (1995). Dual specificity of casein kinase II from the yeast *Yarrowia lipolytica*. *C. R. Acad. Sci. III*, **318**, 937-942
- Cooper A. (1999). Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Current Opinion in Chem. Biology*, **3**, 557-563
- Dajani R., Fraser E., Roe S. M., Young N., Good V., Dale T. C., Pearl L. H. (2001). Crastal structure of glycogen synthase kinase 3 β : structural basis of phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell*, **105**, 721-732

De Bondt H. L., Rosenblatt J., Jancaric J., Jones H. D., Morgan D. O., Kim S. H. (1993). Crystal structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1 Å resolution. *Nature*, **367**, 704-711

De Moliner E., Moro S., Sarno E., Zanotti G., Pinna L. A., Battistutta R. (2003). Inhibition of protein kinase CK2 by anthraquinone-related compounds. A structural insight. *J.Biol. Chem.*, **278**, 1831-1836

Dobrowolska G., Meggio F., Marin O., Lozeman F. J., Li D., Pinna L. A., Krebs E. G. (1994). Substrate recognition by casein kinase-II: the role of histidine-160. *FEBS.*, **335**, 237-241

Dobrowolska G., Lozeman F. J., Li Dongxia, Krebs E. G. (1999). CK2, a protein kinase of the next millenium. *Mol. and Cell. Biochem.*, **191**, 3-12

Doyle M. L. (1997). Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Biotechnologie*, **8**, 31-35

Ermakova I., Boldyreff B., Issinger O.-G, Niefind K. (2003). Crystal structure of a C-terminal Deletion Mutation of Human Protein Kinase CK2 Catalytic Subunit. *J. Mol. Biol.*, **330**, 925-934

Faust M., Montenarh M. (2000). Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res.*, **301**, 329-340

Filhol O., Nueda A., Maret V., Gerber-Scokaert D., Benitez M.J., Souchier C., Saoudi Y., Cochet C. (2003). Live-Cell Fluorescence Imaging Reveals the Dynamics of Protein Kinase CK2 Individual Subunits. *Mol. and Cel. Biol.*, **23** (3); 975-987

Girish S. R., Raghavan V. (2001). Osmolytes Stabilize Ribonuclease S by Stabilizing Its Fragments S Protein and S Peptide to Compact Folding-competent States. *J.Biol.Chem.*, **276**, 28789-28798

Gresham T. Weatherly, Gary J. Pielak (2001). Second virial coefficients as a measure of protein-osmolyte interactions. *Protein Science*, **10**, 12 -16

Grankowski N., Boldyreff B., Issinger O.-G. (1991). Isolation and charakterization of recombinant casein kinase II subunits α and β from bacteria. *Eur. J. Biochem.*, **198**, 25-30

- Guerra B. & Issinger O.-G. (1999). Protein Kinase CK2 and its role in cellular proliferation, development and pathology. *Electrophoresis*, **20**, 391-408
- Guerra B., Siemer S., Boldyreff B., Issinger O.-G. (1999). Protein kinase CK2: evidence for a protein kinase CK2 β subunit fraction, devoid of the catalytic CK2 α subunit, in mouse brain and testicles. *FASEB Lett.*, **462**, 353-357
- Guerra B., Issinger O.-G., Wang J.Y. (2004.) Modulation of human checkpoint kinase Chk1 by the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2. *Oncogene*, **22** (32), 4933-4942
- Graham K. C., Litchfield D. W. (2000). The Regulatory β Subunit of Protein Kinase CK2 Mediates Formation of Tetrameric CK2 Complexes. *J. Biol. Chem.*, **275** (18), 5003-5010
- Guo C., Yu S., Davis A.T., Wang H. et al. (2001). A Potential Role of Nuclear Matrix-associated Protein Kinase CK2 in Protection against Drug-induced Apoptosis in Cance Cells. *J. Biol. Chem.*, **276**, N° **8** (23), 5992-5999
- Hanks S. K., Hunter T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.*, **9**, 576-596
- Hanks S. K., Quinn A. M., Hunter T. (1988). The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains. *Science*, **241**, 241-252
- Hathaway G. M., Lubben T. H., Traugh J. A. (1980). Inhibition of Casein Kinase II by Heparin. *J. Biol. Chem.*, **225**, N°17(10), 8038-8040
- Hathaway G. M., Traugh J.nA. (1982). Casein Kinases – Multipotential Protein Kinases. *Curr. Top. In Cell. Regul.*, **21**, 101-127
- Hensley P. (1996). Defining the structure and stability of macromolecular assemblies in solution: the re-emergence of analytical ultracentrifugation as a practical tool. *Structure* **4**, 367-373
- Ho M., Bramson H. N., Hansen D. E., Knowles J. R. Kaiser E. T. (1998). Stereochemical course of the phospho group transfer catalyzed by cAMP-dependent protein kinase. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2680-2681.
- Jacob G., Neckelman G., Jimenez M., Allende C. C., Allende J. E. (2000). Involment of asparagine 118 in the nucleotide specificity of the catalytic subunit of protein kinase CK2.

FEBS Letters, **466**, 363-366

Jakobi R., Traugh J. A. (1995). Site-directed mutagenesis and structure/funktion studies of casein kinase II correlate stimulation of activity by the beta subunit with changes in conformation and ATP/GTP utilisation. Eur. J. Biochem., **230** (3), 1111-1117

Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Pavletich N. P. (1995). Mechanism of CDK2 activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 komplex. Nature, **376**, 313-320

Jelissarov I., Bosshard H.R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the enegetics of biomolecular recognition. J Mol Recognit, **12**, 3-18

Jensen H.H., Hjerrild M., Guerra B., Larsen M. R, Hojrup P, Boldyreff B. (2001). Phosphorylation of the Fas associated factor FAF1 by protein kinase CK2 and identification of serines 289 and 291 as the *in vitro* phosphorylation sites. Int. J. Biochem. Cell. Biol., **33** (6). 577-589

Johnson L. N., Lewis R. J. (2001). Structural Basis for Control by Phosphorylation. Chem. Rev., **101**, 2209-2242

Kantardjieff K. A. & Rupp B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. Prot. Sci., **12**, 1865-1871

Knigton D. R. , Zheng J., Ten Eyck L. F., Xuong N.-H., Taylor S. S., Solvadski J. M. (1991). Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. Science **253**, 414-420.

Lahey J. H., Raggett E. M. (1998). Measuring protein-protein interactions. Current Opinion in Chem Biology, **8**, 119-123

Landesmann-Bollag E., Romieu-Mourez R., Song D. H., et al. (2001). Proteinkinase CK2 in mammary gland tumorigenesis. Oncogene, **20**, 3247-3257

Leroy D., Filhol O., Delcros J. G., Pares S, Chambaz E. M., Cochet C. (1997). Chemical Features of the Protein Kinase CK2 Polyamine Binding Site. Biochemistry, **36**, 1242-1250

- Leroy D., Valero E., Filhol O., Heriche J. K., Goldberg Y., Chambaz E. M., Cochet C. (1994). Modulation of the molecular organization and activity of casein kinase 2 by naturally occurring polyamines. *Cell. And Mol. Biol. Research*, **40** (5/6), 441-453
- Lieberman S. L., Ruderman J. V. (2004). CK2 β , which inhibits Mos function, binds to a discrete domain in the N-terminus of Mos. *Develop. Biol.*, 268 (2), 271-279
- Linhard R. J. (2004). Heparin-Induces Cancer Cell Death *Chem. & Biol.*, **11**, 420-422
- Lüscher B. & Litchfield D. W. (1994). Biosynthesis of casein kinase II in lymphoid cell lines. *Eur. J. Biochem.*, **220**, 521 - 526.
- Linhardt R. J. K. (2004). Heparin-Induced Cancer Cell Death. *Chem. & Biol.*, **11**, 420-422
- Litchfield D.W. (2003). Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J.*, **369**, 1-15
- Manning G., Plowman G. D., Hunter T., Sudarsanam S. (2002). Evolution in protein kinase signaling from yeast to man. *TRENDS in Biochem. Scien.*, **27** (10), 514-520
- Marin O., Meggio F., Sarno S., Cesaro L., Pagano M. A., Pinna L. A. (1999). Tyrosine *Versus* Serine/Threonine Phosphorylation by Protein Kinase Casein Kinase-2. A study with peptide substrates derived from immunophilin Fpr3. *J. of Biol. Chem.*, **274** (41), 29260-29265
- Martel V., Filhol O., Nueda A., Cochet C. (2002). Dynamic Localization/Association of Protein Kinase CK2 Subunits in Living Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **973**, 272 – 277
- Meggio F., Shugar D., Pinna L. A. (1990). Ribofuranosyl-benzamidazole derivatives as inhibitors of casein kinase-2 and casein kinase-1. *Eur. J. Biochem.*, **187**, 89-94
- Mizuno K., Whittaker M.M, Bächinger H. P., Whittaker J. W. (2004). Calorimetric Studies on the Tight Binding Metal Interactions of Escherichia coli Manganese Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.*, **279** (26), 27339-27344
- Meggio F. & Pinna L. A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J.*, **17**, 349-368
- Niefind K., Guerra B., Pinna L. A., Issinger O.-G., Schomburg D. (1998) Crystal structure of the catalytic subunit of protein kinase CK2 from Zea mays at 2.1 Å resolution. *EMBO J.*, **17**,

N°9, 2451-2462

Niefind K., Pütter M., Guerra B., Issinger O.-G. & Schomburg, D. (1999). GTP plus water mimic ATP in the active site of protein kinase CK2. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 1100-1103

Niefind K., Guerra B., Ermakova I., Issinger O.-G. (2000). Crystallisation and preliminary characterization of crystals of human protein kinase CK2. *Acta Crystallogr.*, **D56**, 1680-1684

Niefind K., Guerra B., Ermakova I., Issinger O.G. (2001). Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme. *EMBO J.*, **20**: 5320 – 5321

Nooren I. M. A., Thornton J.M. (2003). Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J.*, **22** N°14, 3486 - 3492

Nooren I.M.A., Thornton J.M. (2003). Structural Characterisation and Functional Significance of Transient Protein-Protein Interactions. *J.Mol.Biol.*, **325**, 991 -1018

O'Farrell F., Loog M., Janson I.M., Ek P. (1999). Kinetic study of the inhibition of CK2 by heparin fragments of different length. *Biochem. et Biophys. Acta*, **1433**, 68-75

Otwinowski Z. & Minor W. (1997). Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Meth. Enzymol.*, **276**, 407-426

Phan-Dinh-Tuy F., Henry J., Boucheix C. et al. (1997). Protein kinases in human leukemic cells. *Am J. Hematol.*, **19** (3), 209-218

Pierce M.M., Raman C.S., Nall B.T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods*, **10**, 213-221

Pinna L. A. (2002). Protein kinase Ck2: a challenge to canons. *J. of Cell Science*, **115**, 1-6

Pinna L. A. (2003). The Raison D'Être of Constitutively Active Protein Kinases: The Lesson of CK2. *Acc. Chem. Res.*, **36**, 378 - 384

Plaza del Pino I. M., Sanchez-Ruiz J. M. (1995). An osmolyte effect on the heat capacity for protein folding. *Biochemistry*, **34** (27), 8621-8630

Ramachandran G. N., Ramakrishnan C., Sasisekharan V., Stereochemistry of polypeptide chain

configurations (1963). J. Mol. Biol., **7**, 95-995

Rishi V., Anjum F., Ahmad F., Pfeil W. (1998). Role of non-compatible osmolytes in the stabilisation of proteins during heat stress. Biochem. J., **329**, 137-143

Roth E. Jr. (1990). Plasmodium falciparum carbohydrate metabolism: a connection between host cell and parasite. Blood Cells, **16** (2-3), 453-460

Russo A. A., Jeffrey P. D., Pavletich N. P. (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. Nature Struct. Biol., **3**, 696-700.

Santoro M. M., Liu Y., Khan S. M., Hou L. X., Bolen D. W. (1992). Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. Biochemistry, **31** (23), 5278-5283

Sarno S., Reddy H., Meggio F., Ruzzene M., Davies S. P., Donella-Deana A., Shugar D., Pinna L. A. (2001). Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). FEBS Lett., **496**, 44 -48

Sarno S., Marin O., Meggio F., Pinna L. A. (1993). Polyamines as negative regulators of casein kinase-2: The phosphorylation of calmodulin triggered by polylysine and by the α [66-68] peptide is prevented by spermine. Biochem. and Biophys. Research. **194**, 83-90

Sarno S., Vaglio P., Meggio F., Issinger O.-G., Pinna L. A. (1996). Protein Kinase CK2 Mutants Defective in Substrate Recognition. Purification and kinetic analysis. J. of Biol. Chem., **271** (18), 10595-10601

Sarno S., Vaglio P., Marin O., Issinger O.-G., Ruffato K., Pinna L. A. (1997). Mutational Analysis of Residues Implicated in the Interaction between Protein Kinase CK2 and Peptide Substrates. Biochemistry, **36**, 11717-11724

Singh S., Singh J. (2003). Effect of polyols on the conformational stability and biological activity of a model protein lysozyme. AAPS PharmSciTech, **4** (3): E42

Sydney O. U. and Shireesh P. A. (2004). The Effect of Buffers on Protein Conformational Stability. Pharm. Technol.

Songyang Z., Lu K. P., Kwon Y.T., et al. (1996). A Structural Basis for Substrate Specificities of Protein Ser/Thr Kinases : Primary Sequence Preference of Casein Kinases I and II, NIMA,

Phosphorylase Kinase, Calmodulin-Dependent Kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol. And Cel. Biol.*, **16** (11), 6486-6493

Srinivasan N., Antonelli M., Jycob G., Korn I., et al (1999). Structural interpretation of side-directed mutagenesis and specificità of the catalytic subunit of protein kinase CK2 using comparative modelling. *Prot. Engineer.*, **12**, N°2, 119-127

Taneja S., Ahmad F. (1994). Increased thermal stability of proteins in the presence of aminoacids. *Biochem.J.*, **303**, 147-153

Unger G.M., Davis A.T., Slaton J.W., Ahmed K. (2004). Protein Kinase CK2 as Regulator of Cell Survival: Implications for Cancer Therapy. *Curr. Cancer Drug Targ.*, **4**, 77-84

Valero E., De Bonis S., Wade R.H. et al. (1995). Quaternary Structure of Casein Kinase 2. Characterization of multiple ologomeric states and relation with its catalytic activity. *J.Biol.Chem.*, **270** (14), 8345-8352

Verma R., Chen K.Y. (1997). Spermine stimulates the phosphorylation of the nuclear matrix proteins catalyzed ba nuclear kinase II. *Front. In Bioscien.*, **2**, a26-30

Walz K., Pardo P.S., Passeron S. (1997). Purification and characterization of protein kinase CK2 from *Candida albicans*: evidence for the presence of two distinct regulatory subunits beta and beta'. *Arch. Biochem. Biophys.*, **340** (2), 347-354

Wang H., Davis A., Yu S., Ahmed K. (2001). Response of cancer cells to molecular interruption of the CK2 signal. *Mol. And Cell. Biochem.*, **227**, 167-174

Weinkauff S., Hunt J. F., Scheuring J., Henry L., Oliver D. B., Deisenhofer J. (2001). Conformational stabilisation and crystallisation of the SecA translocation ATPase from *Bacillus subtilis*. *Acta Cryst.*, **D 57**, 559-565

Wen-Bin Ou, Young-Doo Park, Hai-Meng Zhou (2001) Molecular mechanism for osmolyte protection of creatine kinase against guanidine denaturation. *Eur.J.Biochem.*, **268**, 5901-5911

Weber Patricia C., Salemme F. Raymond (2003). Applications of calorimetric methods to drug discovery and the study of protein interactions. *Current Opinion in Struct. Biology*, **13**, 115-121

Wilson L. K., Dhillon N., Thorner J., Martin G.S. (1997). Casein kinase II catalyses tyrosine phosphorylation of the yeast nucleolar immunophilin Fp3. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12961-12967

Zheng J. (1993) 2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Cryst. D.Biol. Crystallogr.*, **49**, 362-365

Zhang C., Vilk G., Canton D.A., Litchfield D.W. (2002). Phosphorylation regulates the stability of the regulatory CK2 β subunit. *Oncogene*, **21**, 3754-3764

Lebenslauf

21.06.1971	geboren am 21.06.1971 in Osinovka, Weißrußland
1978 - 1988	Mittelschule in Murmansk, Russland; Mittelschule in Seweromorsk, Russland
1988 – 1994	Studium der Chemie an der Kaliningrader Staatl. Universität
1994	Diplomarbeit an der Kaliningrader Staatl. Universität. Fach Physikalische Chemie. Thema der Diplomarbeit: Verbesserung der Korrosionsfestigkeit von Lackfarbschichten durch Beimengung von gewissen Substanzen. Diplom-Note: sehr gut
1995 – 1998	Direktaspirantur an der Kaliningrader Staatl. Universität Fach: Physikalische Chemie
Seit Oktober 2000	Anfertigen der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Schomburg